Ministère de l'Agriculture

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
SERVICE DE DOCUMENTATION
VERSAILLES

ETUDES DE VIROLOGIE APPLIQUEE

27 MARS 1963

n°4 Mars 1963.

Station Centrale de Pathologie Végétale

Service de Virologie - VERSAILLES.

S O M M A I R E

- Courbes de dilutions des complexes inhibiteurs de l'huître portugaise (Crassostrea angulata) et de la moule (Mytilus edulis var.gallopro vincialis) ..... P. LIMASSET et L.TRUFFAUT p. 1

- Premiers résultats de transmission de la Flavescence Dorée à des plantes herbacées..... ..... A. CAUDWELL et J.C. BACHELIER p. 9

- Examens au microscope électronique de jus de plantes atteintes de Flavescence Dorée ... . A.CAUDWELL et G.DETIENNE p. 17

- Essai réalisé au champ en 1962 sur la mosaïque du Tabac sur Tomates.. C.M.MESSIAEN - P.MAISON - A.MIGLIORI - M.PROUT p. 25

- Réactions variables d'une variété de Poivron à la mosaïque du Tabac suivant l'âge de la plante ..... C.M.MESSIAEN - P.MAISON - A.MIGLIORI - M.PROUT p. 31

- Mosaïque du Tabac et Mosaïque de la Tomate..... ..... C.M.MESSIAEN - P.MAISON - A.MIGLIORI - M.PROUT p. 32

- Le problème du diagnostic précoce des virus de la Pomme de terre cultivée au champ .... H.AUGIER de MONTGREMIER et J.ALBOUY p. 35

- Effet inhibiteur des extraits de semence de piment sur le virus de la mosaïque du Tabac..... J.M.FELDMAN p. 39

- Comparaison de l'activité ribonucléasique de pommes de terre saines et atteintes d'enroulement..... ..... D.SPIRE et M.C.BRAEM p. 47

- Aspects morphologiques de la Chlorantie du Colza. G.MORVAN p. 51

- Premières observations relatives à l'apparition dans la région parisienne de maladies à virus de type "jaunisse" sur tomate ..... M.T.COUSIN p. 55

- Effet de l'alumine hydratée sur le pouvoir infectieux d'une préparation de virus du "Southern bean mosaïc ..... B.DIGAT p. 69

- Mise au point - La nature de l'information génétique pour la synthèse des protéines .....P. BOISTARD p. 73

- Analyse d'un complexe de virus sur celeri (Apium graveolens)..... D.SPIRE et J.BERTRANDY p.103

(Voir suite au dos) .../...

- Observations sur le comportement du haricot infecté par le virus de la mosaïque commune — J.C.DEVERGNE — p.III

- Etude comparée de deux virus du tabac pouvant infecter le haricot ..... J.C.DEVERGNE — p.117

- Etude microscopique et sérologique d'une fraction infectieuse isolée de fève ..... J.C.DEVERGNE — p.125

- Isolement, propriétés physiques et sérologiques du virus de la dégénérescence infectieuse chez les chenopodes et la vigne..... A.VUITTENEZ et J.KUSZALA — p.I33

- Hypothèses sur les fonctions de l'A.R.N. viral... ..... P.CORNUET et S.ASTIER — p.I43

COURBES DE DILUTIONS DES COMPLEXES INHIBITEURS DE L'HUÎTRE PORTUGAISE (Crassostrea angulata) ET DE LA MOULE (Mytilus edulis var. galloprovincialis)

par P. LIMASSET et L. TRUFFAUT

L'étude du pouvoir inhibiteur en fonction de la dilution des extraits d'organes étudiés exige la réalisation de tests de lésions locales aussi précis que possible. Dans presque toutes les expériences l'hôte utilisé était le Tabac Xanthi nc. Le virus était toujours celui de la Mosaïque du Tabac.

La courbe (1), établie en portant en abcisses les logarithmes d'une série de dilutions du virus de la Mosaïque du Tabac et en ordonnées les valeurs arithmétiques du nombre de lésions locales par demi-feuille, donne une idée de la précision des dosages que permet cette plante lorsque le nombre des lésions est supérieur à 50 et inférieur à 200. L'abrasif était la celite et les chiffres correspondent à la moyenne de 6 répétitions par dilution de virus. La valeur du chiffre le plus élevé est assez douteuse en raison de la confluence de nombreuses lésions.

Les courbes de dilution des inhibiteurs étaient effectuées avec une dilution de virus constante permettant d'obtenir, sur les témoins, un nombre moyen de lésions par demi-feuille aussi voisin que possible de 100. L'extrait d'organisme renfermant les inhibiteurs était appliqué au pinceau, sur une demi-feuille à la surface de l'épiderme supérieur, après addition de mouillant tween à 4 p. 1000. La moitié témoin, située de l'autre côté de la nervure recevait de l'eau additionnée du même mouillaht. On avait vérifié au préalable que ce mouillant était dépourvu d'action inhibitrice propre.

L'un de nous a montré ailleurs que les inhibiteurs de l'Huître portugaise et de la Moule diffusent dans les tissus. Dans ces conditions, si on inocule toute la surface des feuilles aussitôt après l'inoculation, et *à fortiori* plusieurs heures après celle-ci, les moitiés témoins sont elles-mêmes inhibées. L'inhibition apparente calculée d'après le nombre de lésions qu'elles présentent est donc inférieure à l'inhibition réelle.

Appelons $\bar{x}$ le nombre moyen de lésions sur les moitiés ayant reçu l'extrait inhibiteur et $\bar{X}$ le nombre moyen des lésions sur les moitiés témoins, l'inhibition apparente est représentée conventionnellement par la valeur exprimée en pour cent :

$$Ia = 100 \frac{\bar{X} - \bar{x}}{\bar{X}}$$

Nous avons essayé d'évaluer l'inhibition des moitiés témoins en faisant alterner, sur les mêmes plantes, des feuilles recevant l'extrait sur une moitié et d'autres ne recevant que de l'eau. Soit X' le nombre moyen des lésions sur les moitiés de ces dernières. L'inhibition des moitiés témoins des feuilles ayant reçu l'inhibiteur est

$$I_t = \frac{\bar{X}' - \bar{X}}{X'}$$

et l'inhibition exacte des moitiés ayant directement reçu l'extrait inhibiteur est :

$$I_e = 100 \ \frac{\bar{X}' - x}{\bar{X}'}$$

Celle-ci peut être exprimée en fonction de I_t sous la forme

$$I_e = I_a + 100 \ \frac{x \, I_t}{\bar{X}}$$

Ce mode d'expression montre que la différenoe entre I_e et I_a devient négligeable quand l'inhibition apparente est élevée (valeur très faible de $\frac{x}{\bar{X}}$) Elle peut par contre devenir importante dans la zone des inhibitions moyennes.

Un essai réalisé avec un extrait de Moule donnait les valeurs suivantes

$\bar{x} = 19, 75$; $\bar{X} = 65, 37$; et $\bar{X}' = 90, 20$

Les moyennes $\bar{x}$ et $\bar{X}$ étaient calculées sur 24 répétitions et X' sur 48. Les valeurs calculées des différentes catégories d'inhibitions étaient

$I_a = 69, 7\ \%$ $I_t = 27, 5\ \%$ et $I_e = 78, 1\ \%$

Une telle méthode de correction est laborieuse car de nombreuses répétitions sont nécessaires pour réaliser correctement des comparaisons entre feuilles. En outre la précision reste faible. Au lieu de corriger l'interférence de l'inhibiteur sur les moitiés témoins, il faut donc empêcher celle-ci.

Nous avons d'abord travaillé sur des demi-feuilles en survie. Aussitôt avant le traitement chaque feuille était détachée de la plante et sectionnée le long de la nervure médiane. Une seule moitié recevait l'inhibiteur. Les deux moitiés étaient inoculées 2 h plus tard. La survie était assurée dans un récipient transparent placé sous tube fluorescent. Cette technique ne nous a pas donné satisfaction. Le graphique 3 établie en logarithmes - probits, dans lequel on a mis en comparaison le pouvoir inhibiteur d'une série de dilutions d'extraits d'Huître mesurées sur feuilles en survie et sur feuilles en place en donne la raison. Dans cet essai, les deux moitiés des feuilles traitées étant inoculées simultanément 2 h après l'inoculation, les feuilles en place ne donnent que l'inhibition apparente Ia. Les feuilles

en survie, dont le témoin est préservé de toute pénétration d'inhibiteur, devraient manifester une inhibition Ie supérieure à Ia. Or, on observe exactement le contraire. On voit en outre que la courbe d'inhibition a une allure tout à fait différente. L'effet est beaucoup moins net avec l'extrait de Moule qui a donné deux courbes plus voisines l'une de l'autre. La raison exacte de ces anomalies n'a pas été élucidée et il serait intéressant d'étudier de façon plus approfondie les réactions des feuilles en survie.

Ceci n'a pas été fait car il nous a été possible d'éliminer l'interférence d'inhibition sur les moitiés témoins en inoculant celles-ci une heure avant le dépôt de l'inhibiteur sur l'autre moitié. Cette façon de procéder a été généralisée dans tous les essais.

ETABLISSEMENT DES COURBES D'INHIBITION. -

Les essais de dilution étaient réalisés à l'aide de Tabacs Xanthi nc (1) écimés sur lesquels on conservait 4 ou 5 feuilles. Chaque test de dilution comportait 4 ou 5 répétitions. Les moitiés témoins étaient d'abord inoculées. L'extrait était déposé 1 h plus tard sur les autres moitiés. Enfin 2 h après cette opération les moitiés traitées étaient lavées, saupoudrées de célite puis inoculées à leur tour.

En coordonnées semi logarithmiques (logarithme des dilutions, valeurs arithmétiques des inhibitions) la courbe dressée après numération des lésions locales présente une forme en S, ainsi que le montre le graphique 3. Lorsque les inhibitions sont portées en probits la courbe est voisine d'une droite dans sa région moyenne ainsi qu'on peut le voir sur le graphique 4 qui se rapporte à la même expérience que le graphique 3. Dans la plupart des cas cependant, comme on peut l'observer sur le graphique 4, la courbe s'écarte de la droite pour les fortes concentrations en inhibiteur et atteint plus rapidement que celle-ci la valeur 100 %. On n'observe jamais, dans cette zone, de points expérimentaux situés au-dessous de la droite. Le relèvement de la courbe ne saurait donc être attribué à des erreurs expérimentales.

Nous avons essayé d'expliquer cette anomalie en tenant compte du fait que les liquides testés n'ont été soumis à aucune purification, de sorte que rien n'empêche de supposer qu'ils renferment plusieurs inhibiteurs. Le graphique 5 a été établi de façon assez arbitraire, dans le seul but de fournir une explication plausible du phénomène. On a supposé qu'un extrait renfermait deux inhibiteurs ayant, en mélange, une action additive. L'activité de l'inhibiteur (1) serait représentée en coordonnées logarithmes-probits par une droite de faible pente établie en s'inspirant du graphique 5 et l'activité de l'inhibiteur (2) par une droite de pente beaucoup plus raide. On voit que, pour les fortes dilutions, l'action de l'inhibiteur (2) est nulle ou négligeable. Dans cette zone l'action inhibitrice du mélange se confond donc avec celle de (1). Lorsque la dilution est moins élevée l'action inhibitrice x du

---

(1) - Un essai a été réalisé sur le Datura stramonium dont le comportement est très voisin.

mélange, supposée égale à la somme des inhibitions provoquées par (1) et (2), est fournie par l'équation

$$x = I_1 + \frac{I_2}{100}(100 - I_1)$$

dans laquelle x représente l'inhibition du mélange exprimée en pour cent, I_1 et I_2 étant les inhibitions respectives des inhibiteurs élémentaires (1) et (2), également exprimées en pour cent.

On voit que la courbe globale ainsi construite a une allure très voisine de celle de la courbe expérimentale du graphique 4. Ceci ne suffit pas à justifier notre hypothèse. Notons cependant que les premiers essais de purification réalisés en collaboration avec M. COIC et Mme LESAINT paraissent bien indiquer l'existence, dans les extraits d'Huître et de Moule, d'au moins deux inhibiteurs distincts. Lorsque ceux-ci auront été convenablement séparés il sera facile de déterminer leurs courbes individuelles et les courbes globales dans un mélange. On saura ainsi si les choses se passent bien comme nous le supposons.

Dans toutes les courbes obtenues jusqu'à présent, l'ordonnée 50 % se trouve sur la partie rectiligne de la courbe. L'abcisse correspondante donne la dilution inhibitrice 50 ou D I 50, définie par analogie avec la D L 50 des fongicides. Les inhibiteurs peuvent être comparés, sur un hôte donné et dans une même expérience, par leur D I 50 et la pente de la droite (ou l'écart type).

L'obtention de courbes plus précises, obtenues avec des inhibiteurs purifiés, devra permettre de traduire les gradients d'inhibition en gradients de concentration. Un exemple fera comprendre l'intérêt de cette étude.

Nous avons démontré, grâce à des essais publiés antérieurement, que les inhibiteurs contenus dans les extraits migraient dans le parenchyme foliaire. Dans une expérience réalisée avec un extrait d'Huître nous constations, par exemple, que le traitement de l'épiderme supérieur 2 h avant l'inoculation de ce dernier donnait une inhibition de 98 % tandis que le traitement de l'épiderme inférieur sur d'autres demi-feuilles alternant avec les précédentes sur les mêmes plantes, fournissaut une inhibition voisine de 71 % (1). Supposons que la courbe d'inhibition du produit soit établie avec précision à l'aide d'un étalon d'inhibiteur purifié de concentration connue. Admettons que l'ordonnée 98 % corresponde, par exemple, à la dilution 10^{-1} de cet étalon et l'ordonnée 71 % à la dilution 10^{-2}. On pourra en conclure que si l'on applique sur l'épiderme inférieur un inhibiteur à la dilution 10^{-1}, la concentration dans les cellules de l'épiderme supérieur, 2 h plus tard, est la même que si on avait appliqué directement sur celui-ci la dilution 10^{-2}. Dans la traversée du parenchyme, d'un épiderme à l'autre, le gradient aurait donc une valeur telle que la concentration serait divisée par 10 à la fin du parcours. Connaissant ce gradient il serait alors possible de calculer la dilution à appliquer sur l'épiderme en vue d'obtenir, dans

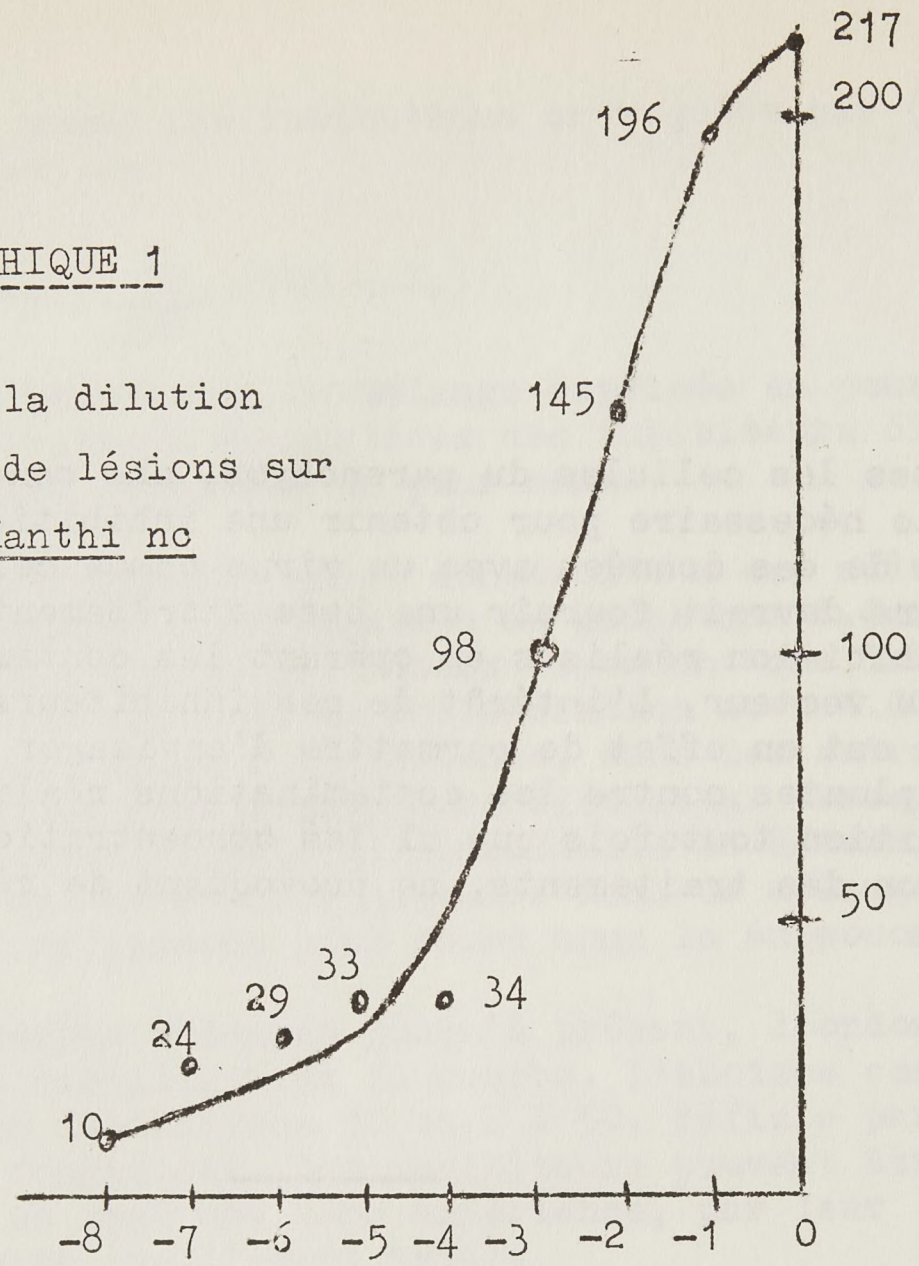
(1) - L'inoculation était faite, comme dans le cas précédent, sur l'épiderme supérieur.

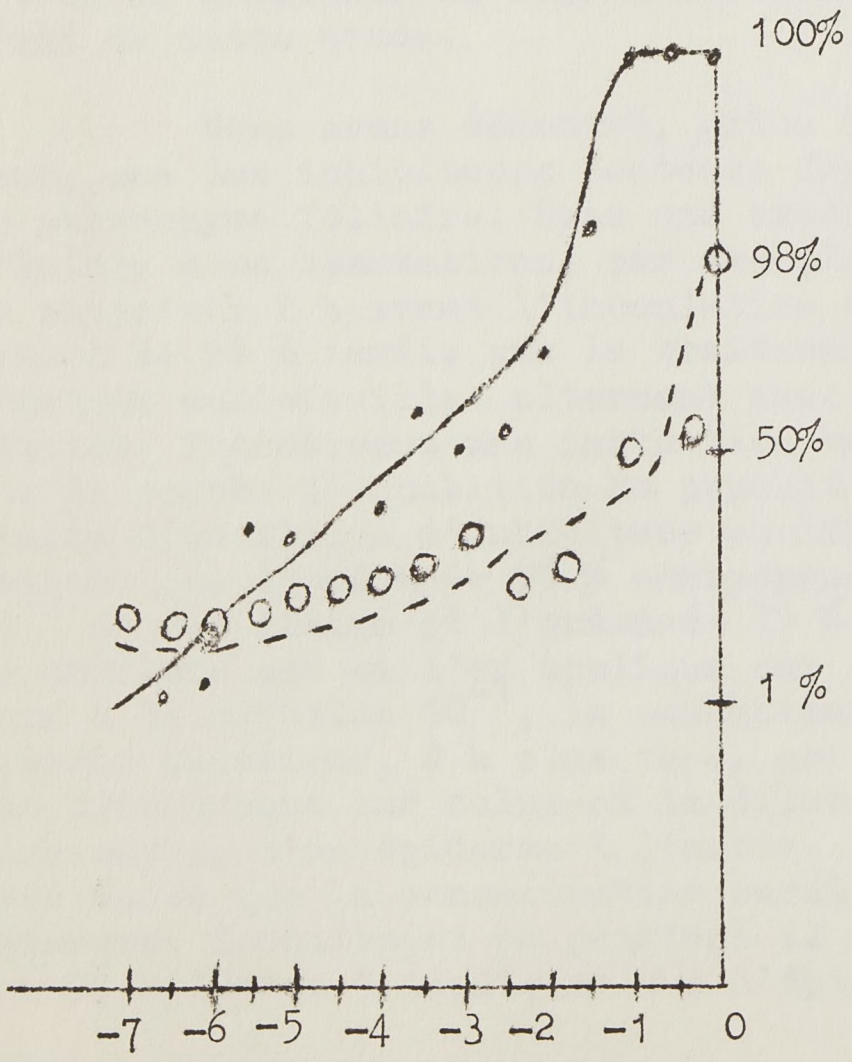
toutes les cellules du parenchyme, une concentration au moins égale à celle nécessaire pour obtenir une inhibition de 100 %. La transposition de ces données avec un virus comme celui de la Mosaïque du Concombre devrait fournir une base extrêmement précieuse pour les tests d'inhibition réalisés en opérant les contaminations à l'aide d'un insecte vecteur. L'intérêt de ces inhibiteurs à haut pouvoir de diffusion est en effet de permettre d'envisager la possibilité de protéger des plantes contre les contaminations réalisées par des insectes, à condition toutefois que ni les concentrations nécessaires ni la répétition des traitements, ne provoquent de réactions phytotoxiques.

GRAPHIQUE 1

en abcisses : log. de la dilution

en ordonnées : nombre de lésions sur tabac Xanthi nc





GRAPHIQUE 2

(extrait d'Huître)

abc. : log. de la dilution

ord. : probits de l'inhibition

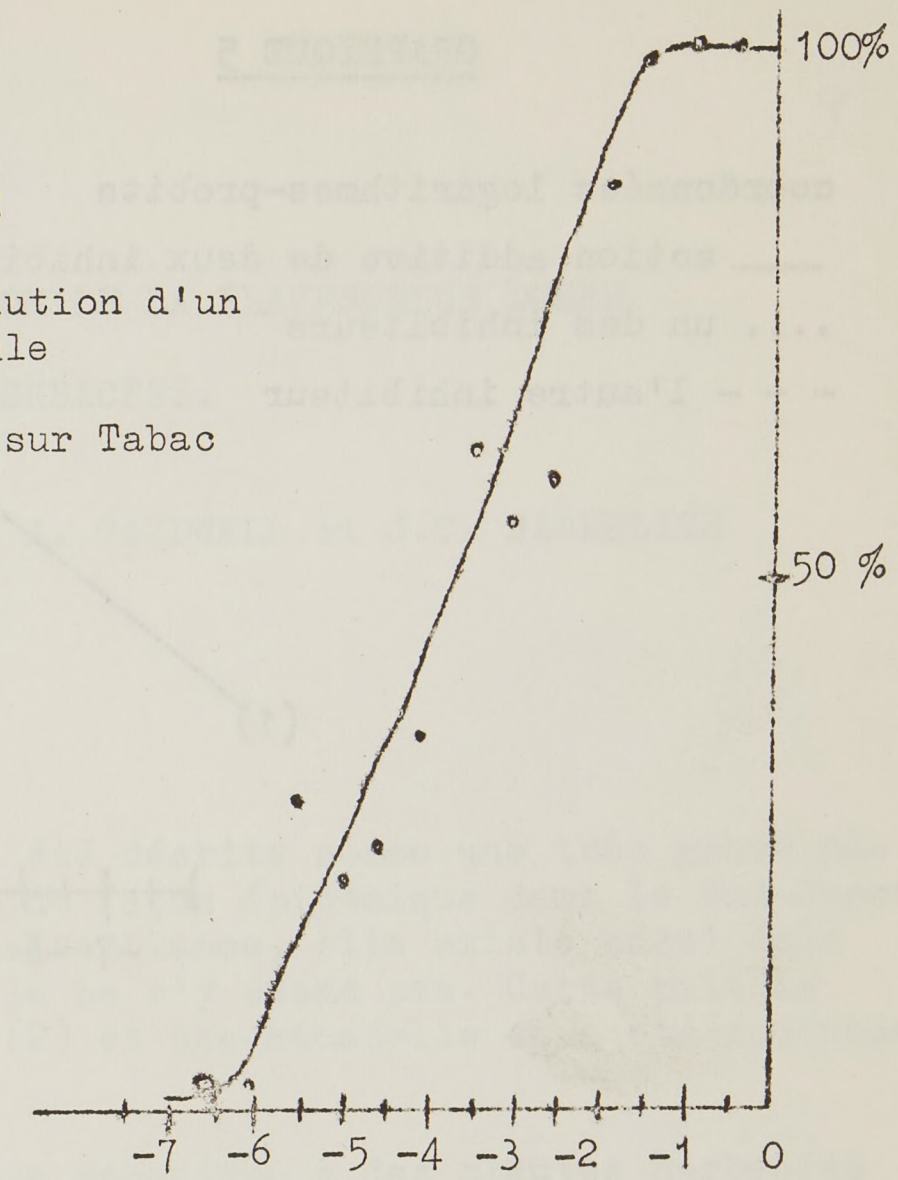
—— feuilles en place

- - - feuilles en survie

GRAPHIQUE 3

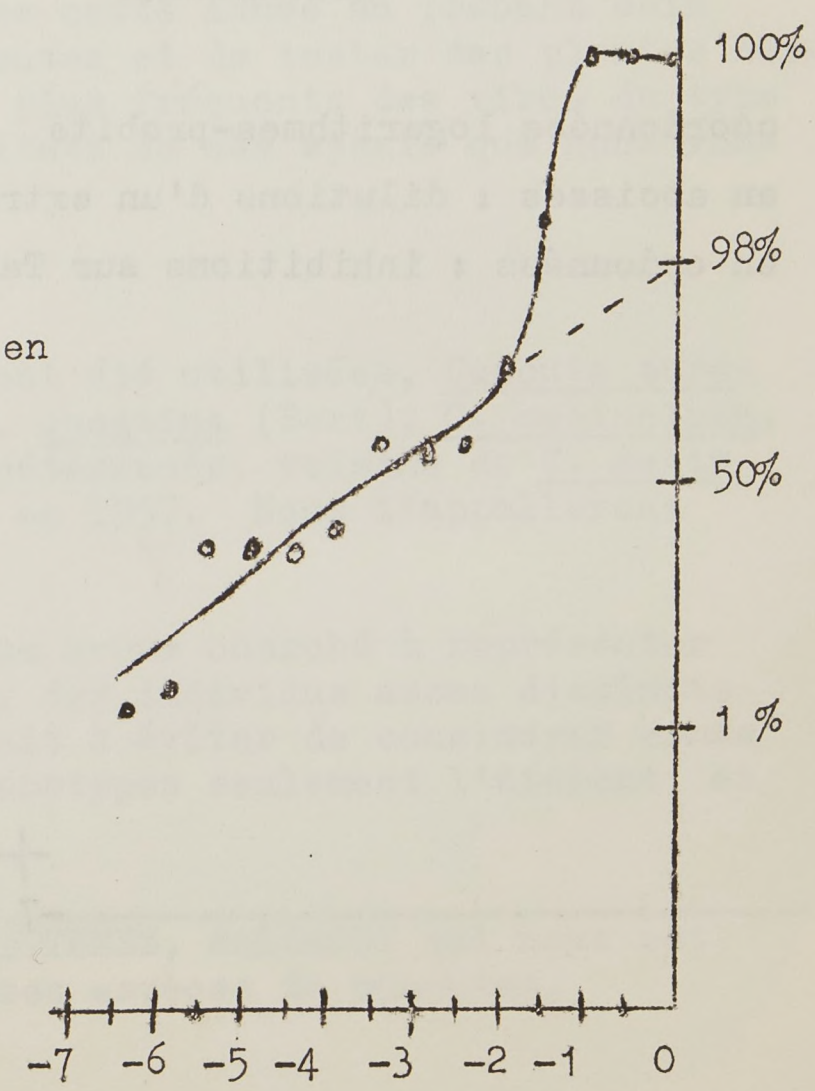
abcisse : log. de la dilution d'un extrait de Moule

ordonnées : inhibitions sur Tabac Xanthi nc



GRAPHIQUE 4

Même courbe que graphique 3 en ordonnées probits.



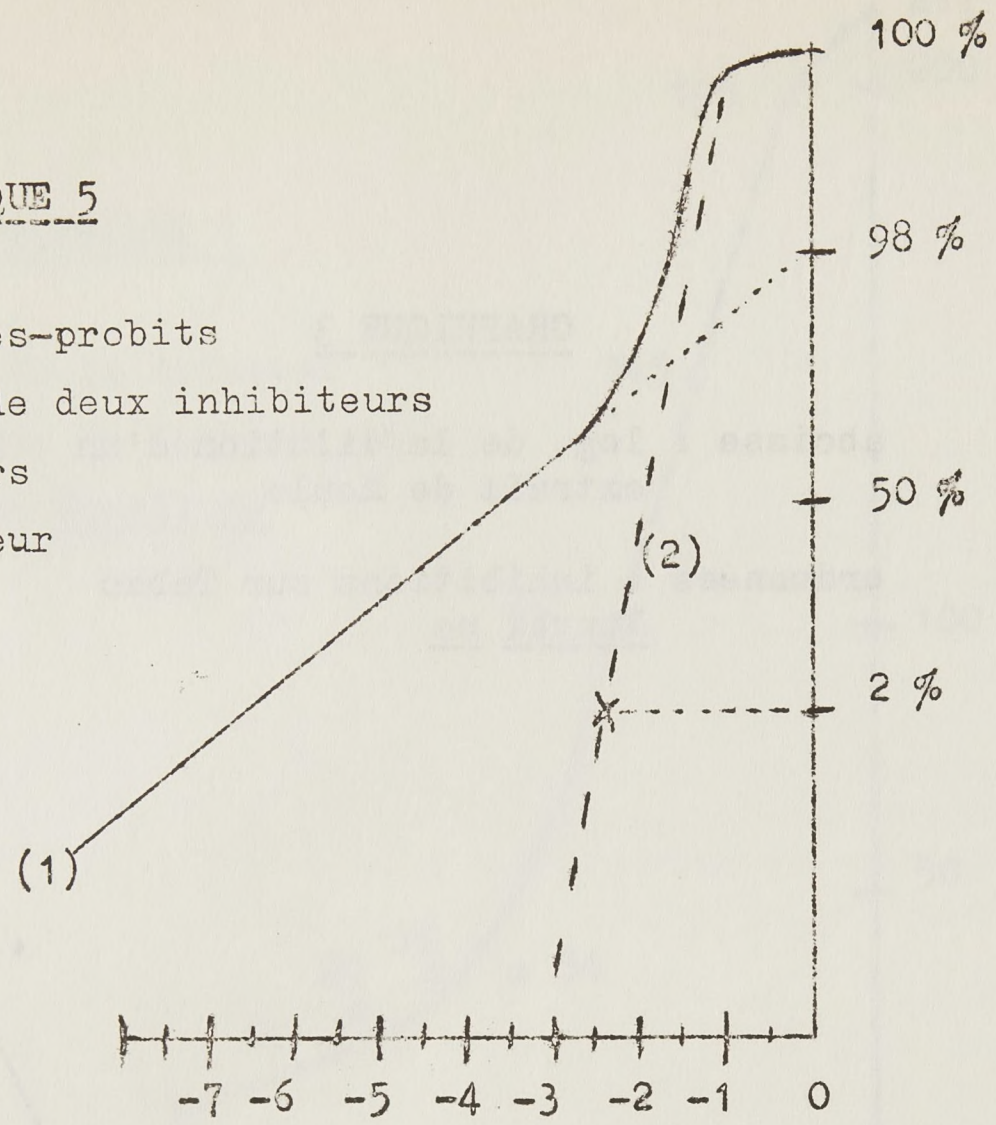
GRAPHIQUE 5

coordonnées logarithmes-probits

____ action additive de deux inhibiteurs

.... un des inhibiteurs

- - - l'autre inhibiteur

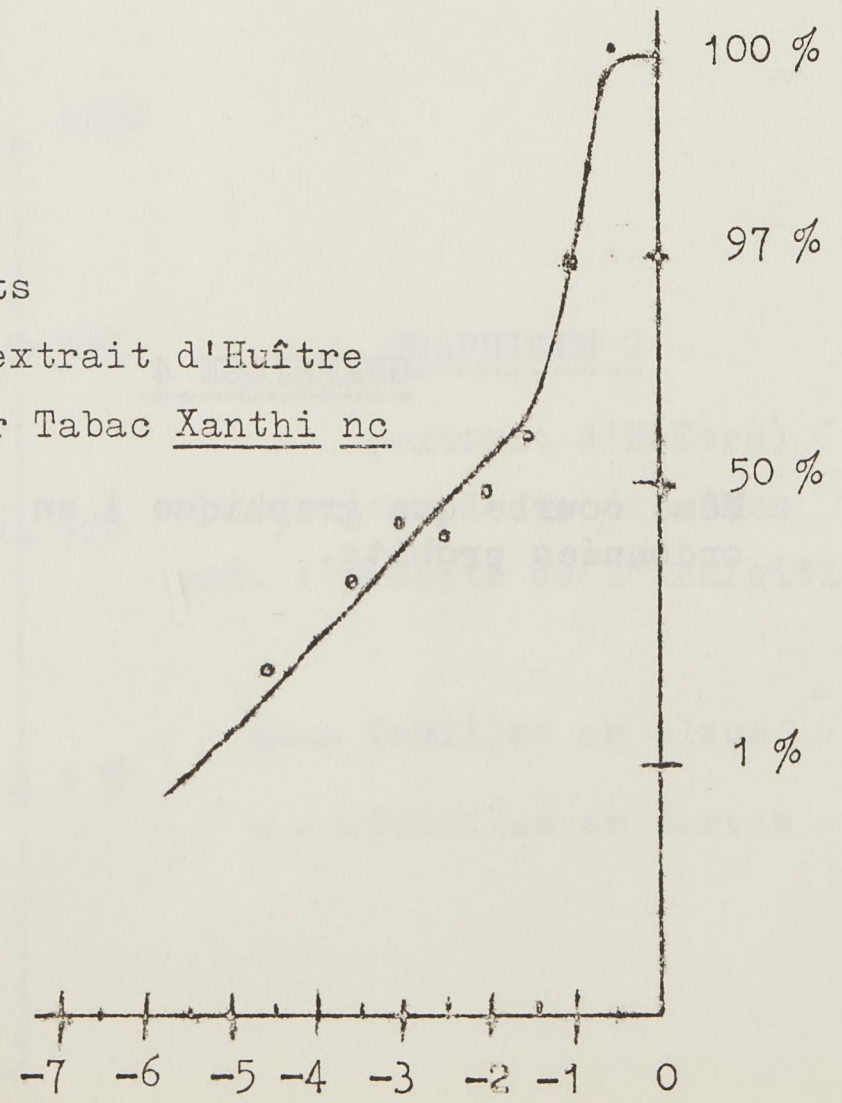


GRAPHIQUE 6

coordonnées logarithmes-probits

en abcisses : dilutions d'un extrait d'Huître

en ordonnées : inhibitions sur Tabac Xanthi nc



PREMIERS RESULTATS DE TRANSMISSION DE LA FLAVESCENCE DOREE A DES PLANTES HERBACEES.

A. CAUDWELL et J.C. BACHELIER

La Flavescence dorée a été décrite comme une très grave maladie de la Vigne qui se propage de façon épidémique dans le Sud-Ouest de la France (2). Selon toute vraisemblance, elle existe aussi dans d'autres régions (3, 5), mais elle ne s'y étend pas. Cette maladie est transmissible par la greffe (2) et une cicadelle en a été reconnue vectrice (6).

Les essais d'inoculation mécanique à des plantes herbacées sont restés sans résultat (2). Nous avons, pour cette raison, tenté dès 1957 des transmissions par ponts de cuscute, mais elles ont été faites à l'époque sur une trop petite échelle. Cette technique que l'on doit à BENNETT (1) a été reprise cette année en prenant soin d'utiliser plusieurs espèces de cuscutes et de tester des plantes herbacées choisies parmi les hôtes les plus fréquents des virus du type jaunisse. Ce sont les premiers résultats de ces essais que nous voudrions présenter.

MATERIEL ET METHODES

Cinq espèces de cuscutes ont été utilisées, Cuscuta europaea (L), C. australis (R. Br.) var. cesatina (Bert), C. subinclusa, C. monogyna (Vahl) et une espèce indéterminée, voisine de C. subinclusa que nous avions déjà employée en 1957. Nous l'appellerons Cuscuta 57 (°).

Dans un premier stade, nous avons cherché à représenter chaque espèce de plante herbacée par des individus assez distincts génétiquement. Cette précaution visait à éviter de considérer comme sensible une espèce dont certains génotypes seulement l'étaient, et réciproquement.

(°) Nous remercions MM. CORNUET, VUITTENEZ, BALDACCI qui nous ont fourni les graines de ces diverses espèces de cuscutes.

RESULTATS

Trente espèces botaniques, appartenant à douze familles, ont été inoculées. La plupart d'entre-elles n'ont montré aucun symptôme (voir tableau ci-dessous).

	Nombre de plantes		
	inoculées	survivantes 3 mois après l'inoculation	ayant montré des symptômes
Cucumis sativus	2	1	0
Solanum nigrum (L)	6	0	
Lycopersicum esculentum	4	4	0
Convolvulus arvensis (L)	3	2	0
Chenopodium amaranticolor	2	2	0
Daucus carota (L)	2	2	0
Capsella bursa-pastoris (Moench)	1	1	0
Stellaria media	2	0	
Plantago major (L)	5	5	0
Plantago lanceolata (L)	13	12	8
Vinca rosea	4	3	0
Sonchus oleraceus	1	0	
Senecio vulgaris (L)	4	0	
Trifolium pratense (L)	5	5	0
Trifolium subterraneum (L)	2	1	0
Trifolium incarnatum (L)	4	1	1
Trifolium arvense (L)	1	0	
Trifolium repens (L)	1	1	0
Trifolium repens var. ladino	4	4	3
Melilotus indica	2	0	
Melilotus alba (Lam)	2	2	2
Lathyrus odoratus	7	2	0
Vicia Faba (L)	7	3	0
Medicago lupulina (L)	2	2	1
Medicago maculata (Willd)	3	2	1
Medicago sativa (L)	6	5	2
Lotus corniculatus (L)	2	2	0
Phaseolus vulgaris	3	2	1
Vitis (Baco 22 A)	6	6	0

(On n'a compté que les plantes inoculées avant le 1/8/1962)

Plantain lancéolé infecté artificiellement par la Flavescence dorée : les épis sont transformés en phyllodies.

En A : Capitule de Trèfle ladino transformé en phyllodie, puis en balais de sorcière à la suite d'une infection artificielle par la Flavescence dorée.

Phyllodie présentée par un Plantain lancéolé infecté artificiellement par la Flavescence dorée.

Quelques unes, comme Trifolium incarnatum, Medicagc lupulina et Medicago sativa ont présenté des symptômes du type balais de sorcières, accompagnés dans le cas de cette dernière luzerne d'un défaut total de rigidité des rameaux. Ces symptômes n'ont été remarqués que sur un petit nombre de plantes et les essais sont actuellement poursuivis afin de réaliser les vérifications nécessaires. On peut également considérer comme encore douteux les symptômes observés sur Medicago maculata et Phaseolus vulgaris qui consistent en une fréquente réduction du nombre de folioles. Nous ne notons ces cas ici qu'en raison de leur parenté avec les symptômes que nous allons maintenant décrire.

Sur trois espèces, des symptômes très nets se sont manifestés. Il s'agit de Plantago lanceolata, Melilotus alba et Trifolium repens variété ladino. Dès le mois de juin 1962, un Plantain lancéolé inoculé avait présenté un développement exagéré d'une des bractées situées à la base de l'épi et le pédoncule floral a continué à se développer au-delà de cette anomalie. La date précoce de cette observation nous a permis de poursuivre sur une grande échelle l'expérimentation sur cette espèce. Les symptômes qu'elle manifeste présentent une certaine variabilité qui est sans doute d'ordre génétique. En dehors du cas que nous venons de décrire, il est fréquent de voir des hampes florales rester courtes et ne porter qu'une seule fleur. Celle-ci voit alors brusquement toutes ses pièces florales se transformer en petites feuilles crispées, tandis que le pédoncule s'allonge. Ce phénomène peut se manifester sur un seul épi ou sur tous les épis de la plante. Parfois certaines pièces florales seulement se transforment en feuilles et le reste de l'épi continue son évolution. Assez fréquemment, ces faits sont accompagnés d'un durcissement des feuilles qui s'enroulent et jaunissent rappelant l'aspect des vignes atteintes de cette maladie. Aussi caractéristiques qu'ils soient, ces symptômes sont assez fugaces. Lorsqu'une seule hampe florale se transforme, ils ne durent que le temps de vie de cet organe. Lorsque toutes les hampes florales sont transformées, de nouvelles hampes, de plus en plus courtes se forment, portant des feuilles de moins en moins crispées et de plus en plus grandes. Les phyllodies se rapprochent alors morphologiquement des bourgeons axillaires normaux qui apparaissent donc en nombre anormalement élevé. Il y a une évolution du symptôme "phyllodie" en celui de "balais de sorcières" et la plante peut reprendre la possibilité de fleurir.

Des symptômes du même type ont été notés sur les trèfles ladino inoculés. Sur une inflorescence ordinaire se développent à côté des fleurs, des feuilles pétiolées normalement développées et bien constituées et de nouveaux pédoncules floraux portant des inflorescences secondaires d'aspect normal. Parfois un stolon ordinaire prend naissance au même niveau, au milieu des fleurs, des feuilles et des tiges florales précédemment développées. Cet ensemble prend

un aspect de balais de sorcière, mais le développement ultérieur de la plante redevient normal.

Chez le mélilot blanc infecté, on assiste d'abord à la virescence de certaines pièces florales, puis à leur développement en folioles isolées ou en groupes de deux, aisément distinguables des feuilles normales trifoliolées. La hampe florale apparaît alors constituée de fleurs banales et de folioles. Par la suite, les fleurs avortent et leurs éléments se transforment directement en feuilles. Plus tard enfin, on n'assiste même plus au stade "fleurs avortées", le mélilot transforme directement ses hampes florales en ramifications banales de la tige.

Sur la base de ces divers symptômes, nous pouvons calculer le temps d'incubation au sein de la plante, compté à partir du jour de l'établissement du pont de cuscute. Il va de 33 à 108 jours dans le cas du plantain lancéolé, de 34 à 62 jours pour le trèfle ladino et il est inférieur à un mois pour le mélilot blanc. Nous n'avons relevé dans le tableau récapitulatif que les plantes inoculées depuis au moins trois mois afin de tenir compte de cette durée de l'incubation.

Les espèces de cuscutes les plus aptes à effectuer les transmissions sont Cuscuta europaea (L), C. subinclusa et C. australis var. cesatina.

Des recherches effectuées aux abords des vignobles atteints de Flavescence dorée en Armagnac et dans le Jura ont permis de retrouver sur les plantains lancéolés spontanés des symptômes analogues à ceux qui ont été obtenus ici artificiellement.

CONCLUSION

La description des symptômes observés sur les plantes herbacées infectées par le virus de la Flavescence dorée fait ressortir le caractère fugitif de manifestations graves. Ces faits permettront peut-être d'apporter des éclaircissements aux phénomènes de rétablissement déjà signalés sur la vigne pour cette virose (4). Les symptômes observés, du type "phyllodie" et "balais de sorcières", confirment le rattachement de la Flavescence dorée aux virus du type "jaunisse" transmis par cicadelles.

En dehors de l'intérêt qu'il peut y avoir à connaître les plantes réservoirs de ce virus de la vigne, la connaissance de ses manifestations sur les plantes herbacées peut permettre de mieux situer les limites de l'extension de cette maladie dans les zones où n'existent que des cépages tolérants.

Les études sont poursuivies en vue de sélectionner des clones très sensibles de plantain lancéolé, de mélilot blanc et de trèfle ladino qui permettront un indexage commode de cette maladie.

BIBLIOGRAPHIE

(1) BENNETT C.W., 1940. Acquisition and transmission of viruses by dodder. Phytopath. 30, 2.

(2) CAUDWELL A., 1957. Deux années d'études sur la Flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. Ann. Amél. Pl., 7, 359-393.

(3) CAUDWELL A., 1961. Etude sur la maladie du Bois noir de la vigne : ses rapports avec la Flavescence dorée. Ann. Epiph., 12, 241-262.

(4) CAUDWELL A., 1961. Les phénomènes de rétablissement chez la Flavescence dorée de la vigne. Ann. Epiph., 12, 347-354.

(5) GÄRTEL W., 1959. Die "Flavescence dorée" oder "Maladie du Baco 22 A". Wund K., 6, 295-311.

(6) SCHVESTER D., CARLE P., MOUTOUS G., 1961, Sur la transmission de la Flavescence dorée des vignes par une cicadelle. C.R. Acad. Agr. Fr., 20 déc. 1961, 1021-1024.

Station de Pathologie végétale du S.O.
I.N.R.A. - PONT-DE-LA-MAYE (Gironde)(PL)

EXAMENS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DE JUS DE PLANTES ATTEINTES DE FLAVESCENCE DOREE.

A. CAUDWELL et G. DETIENNE

Depuis le début des recherches sur la Flavescence dorée, quelques examens de jus de vigne au microscope électronique ont été tentés sans résultat. Il est probable que les tannins et surtout la forte acidité du jus de cette plante créent un milieu très précipitant pour les protéines. Les premiers résultats de transmission de la Flavescence dorée à des plantes herbacées pouvaient changer les données du problème.

Rappelons que trois espèces botaniques, parmi les trente qui ont été testées, ont réagi fortement à la Flavescence dorée ; ce sont : Plantago lanceolata, Melilotus alba et Trifolium repens variété ladino. Toutes trois, infectées par cuscute à partir de vignes malades, ont montré des phyllodies d'un type particulier. Le plantain présentait en outre un enroulement des feuilles accompagné d'un durcissement et d'un léger jaunissement. Ces derniers symptômes se manifestent surtout en plein air et se rapprochent beaucoup de ceux que l'on observe chez la vigne. La luzerne et quelques autres légumineuses réagissent également, mais de façon plus discrète.

METHODE EMPLOYEE

Disposant d'un matériel végétal assez réduit, constitué par les plantes des espèces sensibles inoculées par cuscute au cours de l'année 1962, nous avons choisi une méthode qui réunissait un ensemble de précautions qui semblaient nécessaires dans ce cas particulier.

Dans un premier temps, l'oxygène des tissus a été remplacé dans la mesure du possible par de l'azote, en disposant le matériel végétal dans un dessiccateur à vide et en alternant trois fois le vide pendant une demi-heure et le remplissage par de l'azote.

Les feuilles ont été alors mélangées au même poids d'une solution d'extraction fraîchement préparée et contenant par 100 ml :

4 g de $SO_2O_5K_2$
3 ml de Nicotine de base
0,01 mg de 8-Hydroxyquinoléine.

Le tout a été ensuite passé dans un moulin de ménage et le jus séparé de la pulpe par pression à travers une quadruple épaisseur d'étamine. Une première centrifugation de 10 minutes à 10.000 g a permis une première clarification.

Cette méthode, mise au point par CECH M. et POZDENA J. (1962) pour isoler le virus de la stérilité infectieuse du houblon, a été légèrement modifiée pour notre travail en vue de tenir compte de la possibilité d'une fragilité particulière à la chaleur des virus du type jaunisse (BLACK 1941) auxquels se rattache la Flavescence dorée. Toutes les opérations ont donc été faites à froid, les récipients étant maintenus constamment plongés dans une saumure de température négative.

Cette méthode a été appliquée à des feuilles de vigne malades et saines, à des plantains lancéolés, mélilots blancs, luzerne cultivée et trèfles ladinos. Le pH à la fin de ces opérations était de 7,3 à 7,4 pour les plantes herbacées, de 7,00 à 7,20 pour la vigne. Les jus, après la première centrifugation à 10.000 g, ont été congelés à -15° C et maintenus ainsi durant un mois faute de pouvoir les examiner immédiatement au microscope électronique. Les jus ont été ensuite décongelés, centrifugés à nouveau à 10.000 g pendant 15 minutes pour être clarifiés.

Les centrifugations ultérieures ont été faites à l'aide d'une ultracentrifugeuse SPINCO. Les opérations successives furent les suivantes (1) :

1) 15.000 g pendant 30 minutes
culot examiné — surnageant

2) 73.000 g pendant 60 minutes
culot examiné — surnageant

3) 103.000 g pendant 90 minutes
culot examiné — surnageant examiné.

---

(1) Nous remercions vivement le Laboratoire de Virologie de Versailles et, en particulier, M. CORNUET, M. GALLET et Madame MICHON, pour leur contribution en ce qui concerne les ultracentrifugations et l'examen au microscope électronique.

Les culots étaient repris chaque fois dans le vingtième du volume initial, avec un tampon tris-citrique, pH 7,9. Les examens au microscope électronique étaient alors faits sur ces culots redissouts et traités par de l'acide phosphotungstique neutralisé (1, voir bas page précédente).

RESULTATS

Les jus de vigne n'ont pas donné plus de résultats par cette méthode que par les autres plus simples qui avaient été utilisées précédemment.

En ce qui concerne les plantes herbacées, c'est dans le culot de la centrifugation à 73.000 g que nous avons obtenu quelques résultats : tandis que pour le trèfle ladino et le mélilot blanc, les contrastes étaient mauvais et n'ont pas permis de conclure ; des billes très nombreuses et de taille constante étaient décelées dans le "culot 73.000" du jus de plantain. Ces particules ont un diamètre de 30 mμ. Cette valeur a été déterminée par rapport à la petite dimension du virus de la mosaïque du Tabac photographié au même grossissement (X 100.000).

DISCUSSION

Les particules trouvées représentent-elles le virus de la Flavescence dorée ?

Pour répondre à cette question, il faut examiner le processus qui a conduit à l'obtention des plantains malades. Ceux-ci avaient été reliés par un pont de cuscute à une bouture de vigne atteinte de Flavescence dorée. Il nous faut donc examiner l'état sanitaire possible de la bouture de vigne, de la cuscute et du plantain.

Les boutures de vigne montraient des symptômes accentués de Flavescence dorée et étaient issues de ceps situés dans une zone où aucun symptôme de dégénérescence infectieuse n'avait été aperçu au cours de huit années de notations estivale et hivernale. Si, malgré cette précaution, il y avait eu présence simultanée des deux virus dans les boutures de vigne, la transmission de la Flavescence dorée avait des chances d'être plus aisée, car les cuscutes sont beaucoup plus efficaces pour transmettre les virus du type jaunisse que ceux du type auquel appartient la dégénérescence infectieuse. La vraie raison cependant et sans doute la seule vraiment valable jusqu'à présent, qui nous incite à penser que les billes observées n'étaient pas celles des virus de la dégénérescence infectieuse, réside dans la différence de dimensions. Les particules observées ont un diamètre de 30 mμ alors que dans les mêmes conditions de préparation (acide phosphotungstique), le virus de l'Arabis Mosaïc et ceux de la

dégénérescence infectieuse ont un diamètre de 21,9 mμ. L'écart entre ces deux mensurations dépasse largement les limites de sécurité généralement admises.

Il est connu depuis BENNET (1944) que des cuscutes, même issues de semis peuvent recéler des virus latents. L'existence d'un tel virus n'est pas à exclure a priori dans notre cas. Notons cependant que les cas reconnus de virus de la cuscute se rattachent au type "taches annulaires" par les symptômes qu'ils manifestent sur différentes plantes. La dimension des billes que nous avons observées est supérieure à celle qu'ont en général les virus de ce type. Il est probable en outre que la forte densité de billes a plus de chances de correspondre aux symptômes que présentait intensément le plantain, qu'à un virus auquel il serait tolérant.

Les remarques que nous venons de faire concernant la cuscute valent également pour l'état sanitaire des plantains, en général issus de semis.

Cette discussion montre que s'il y a dès maintenant de grandes chances pour que les billes observées correspondent au virus de la Flavescence dorée, il y a cependant lieu de faire encore quelques réserves. Il fallait dans un premier temps rechercher dans quelles plantes et dans quelles conditions d'extraction et de purification, des particules pouvaient être isolées. Il s'agit à présent de procéder à quelques vérifications simples qui sont dès maintenant entreprises. Ce travail vaut la peine d'être fait avec toute la précision nécessaire, car rares sont jusqu'à présent les virus du type jaunisse qui ont été observés.

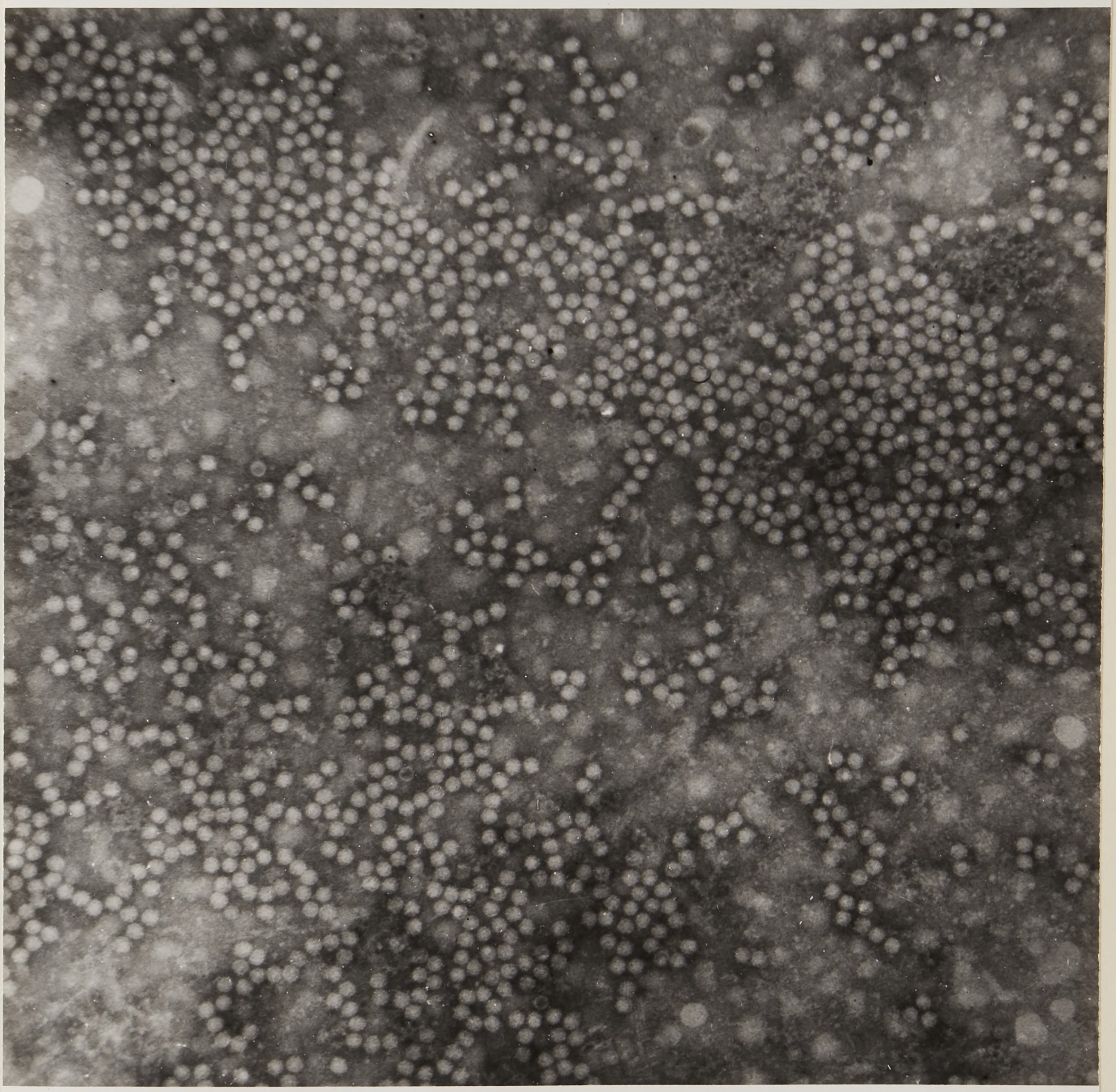
BIBLIOGRAPHIE

BENNET C.W., 1944. Latent virus of dodder and its effect on sugar beet and other plants. Phytopath., 34, 77-91.

BLACK L.M., 1941. Partial purifications of Potato Yellow dwarf virus. Phytopath., 31, 3.

CECH M., POZDENA J., 1962. Untersuchungen über die infektiöse sterilität des Hopfens. Phytopath. Zeitschrift, 44, 273-281.

Station de Pathologie végétale du S.O.
PONT-DE-LA-MAYE (Gironde) (PL)



Cliché électronique de Mme MICHON du 27/11/1962
sur le culot 73.000 du jus D1.

ESSAIS SUR LES VIRUS REALISES EN 1962
PAR LA STATION DE PATHOLOGIE DES PLANTES MARAICHERES
D'AVIGNON

-:-:-:-:-

CM.MESSIAEN — P.MAISON — A.MIGLIORI — M.PROUT

I- Essai réalisé au champ en 1962 sur la Mosaïque du Tabac sur Tomate.

II- Réactions variables d'une variété de Poivron à la Mosaïque du Tabac suivant l'age de la plante.

III- Mosaïque du Tabac et Mosaïque de la Tomate.

-:-:-:-:-:-:-

I- ESSAI REALISE AU CHAMP EN I962 SUR LA MOSAIQUE DU TABAC SUR TOMATE.

Ayant en I960 et I96I acquis des notions à peu près claires sur les dégats que peut provoquer dans la pratique la Mosaïque du Tabac sur Tomate, nous avons voulu en I962 étudier de plus près la croissance et la fructification comparées de plantes saines et virosées.

Notre essai comportait les traitements suivants :

n°1 : plantes sans virus, arrêtées à 5 bouquets, conduites sur une seule tige.

n°2 : comme le n°1, plantes infectées le 10 Mai avec une souche de TMV commune.

n°3 : comme nle n°2, mais avec une souche aucuba*

n°4 : plantes sans virus, non taillées, mais dont les multiples tiges ont cependant été attachées verticalement sur fil de fer.

n°5 : comme le n°4, infecté avec la souche de TMV, comme le n°2.

n°6 : comme le n°5, infecté avec la même souche de TMV que le n°3.

Les piquets sur lesquels nous avons attaché les plantes des n°s 1, 2 et 3 étaient gradués de 10 en 10 cm., ce qui nous a permis de mesurer commodément de semaine en semaine la longueur des tiges.

Les parcelles 4, 5 et 6 étaient destinées à vérifier (fait souvent signalé) que les baisses de rendement provoquées par TMV sont plus accusées sur tomates non taillées que sur tomates taillées.

L'hybride dF_1 utilisé était Loran Blood x Roma, résistant au Verticillium et au Fusarium. La plantation a eu lieu le I5 Avril. La densité de plantation équivalait à 25.000 plantes/hectare pour les n° 1, 2 et 3, à I2500 plantes/ha pour les n° 4, 5 et 6. Les récoltes se sont étendues du 29 Juin au I7 A Août. Le plan d'essai était un carré latin 6x6.

---

* Cette souche, dérivée de la souche Aucuba du Professeur LIMASSET ne s'est montrée finalement pas beaucoup plus virulente que la souche verte commune; il s'agissait d'un mélange souche aucuba + souche verte.

Par suite, sans doute, de quelques négligeaces dans la préparation des plants, nous avons dû éliminer de nos parcelles 1 et 4 des plantes souffrant de contaminations accidentelles, et les nombres de plantes n'étaient pas constants entre parcelles. Nos notations portent au total sur 57 plantes pour le n°1, 87 pour le n°2, 90 pour le n°3, 42 pour le n°4, 48 pour les n° 5 et 6. L'interprétation statistique sera donc complexe et peu sûre, et l'essai devra être recommencé en I963. Cependant, nous pensons pouvoir en tirer déjà quelques conclusions et hypothèses.

L Les effets des deux souches de TMV ayant été finalement similaires nous donnerons les résultats des plantes saines (1 et 4) et les moyennes des résultats obtenus avec les plantes virosées (n°2, et 3, et n°5 et 6).

Le Tableau I résume la croissance comparée des plantes taillées attachées sur piquets gradués, virosées et saines(la longueur des plantes le 24 Avril a été prise comme origine.).

Tableau I

	11 Mai	I8 Mai	29 Mai	5 Juin	I4 Juin	2I Juin
Longueur plantes saines	I5 cm.	23,5 CM	4I,5 cm.	56 cm.	82,5 cm.	I03 cm.
Longueur plantes virosées	I4 cm.	20,5 cm.	25 cm.	43 cm.	65,5 cm.	87 cm.

La contamination avait eu lieu le IO Mai, l'apparition des symptômes le 25 Mai en moyenne. On constate un arrêt très net de croissance des plantes virosées du I8 au 29 Mai, suivi d'un nouveau départ. Cette "crise" suivie de récupération apparait beaucoup mieux encore si l'on fait pour chaque date le rapport :

$$\frac{\text{longueur des plantes malades}}{\text{longueur des plantes saines}}$$

que nous donne le Tableau II :

11 Mai	I8 Mai	29 Mai	5 Juin	I4 Juin	2I Juin
0,933	0,872	0,602	0,768	0,794	0,845

Le Tableau III (cueillettes cumulées) nous donne les résultats suivants, en Kg.par plante (pour les 7 premières colonnes, le rendement total en tonnes/hectare est donné par la 8ème colonne.

Nous indiquerons également le poids moyen des fruits.

(voir Tableau III)

Nous vérifions ainsi que les plantes non taillées montrent une réduction de la récolte totale plus importante que les plantes taillées. Cette différence est encore plus accusée à mi-course. Par contre, en tout début de récolte, les plantes non taillées virosées dépassent les plantes non taillées saines. Les rapports

$$\frac{\text{cueillettes cumulées plantes virosées}}{\text{cueillettes cumulées plantes saines}}$$

nous permettront d'apprécier de façon encore plus nette le phénomène (voir tableau IV). :

Si l'on reporte sur un même graphique les courbes exprimant les rapports plantes virosées/plantes saines pour les longueurs et pour les cueillettes cumulées, on peut faire les constatations suivantes :

1°- Pour les plantes taillées, les deux courbes "longueurs" et "cueillettes" ont exactement la même allure. Elles sont décalées dans le temps de 55 jours environ. Ces 55 jours représentent le temps qui sépare l'épanouissement d'une fleur de tomate de la récolte du fruit correspondant.

2°- Les deux courbes "cueillettes" pour les plantes taillées et non taillées ont des minima simultanés, et des remontées parallèles. Par contre, le point de départ est curieusement élevé pour les plantes non taillées.

INTERPRETATION DES RESULTATS ET CONCLUSION.

En ce qui concerne les plantes taillées, l'interprétation est très simple, et nous sommes à peu près sûrs de la vérifier dans nos essais ultérieurs : les plantes subissent après la contamination, une crise dont le maximum coïncide à peu près avec l'apparition des symptômes. Ensuite elles reprennent une croissance régulière, d'une vitesse presque égale à celle des plantes saines. Du point de vue récolte, ce sont les fleurs épanouies au moment de la crise dont la fructification ultérieure est la plus compromise.

Comment interpréter la courbe bizarre concernant la fructification des plantes non taillées ?

Nous n'avons pas fait de notation précise de longueurs de tiges sur les plantes non taillées, l'opération étant plus difficile, et comportant de gros risques de contaminations accidentelles.

TABLEAU III

	29 Juin	5 Juill.	I3 Juill.	20 Juill	28 Juill	7 Août	I7 Août	Récolte totale tonnes/ha.	Poids moyen des fruits
Plantes taillées saines	0,I3I	0,223	0,327	0,593	I,096	I,768	2,062	5I,5	74,3 gr.
Plantes taillées virosées	0,I27	0,I82	0,274	0,397	0,750	I,436	I,702	42,5	69,7 gr.
Plantes non taillées saines	0,038	0,I3I	0,233	0,528	I,379	3,702	5,375	67,2	63,I gr.
Plantes non taillées virosées	0,069	0,I4I	0,I8I	0,292	0,968	2,773	4,034	50,42	58,6 gr.

TABLEAU IV

	29 Juin	5 Juillet	I3 Juillet	20 Juillet	28 Juillet	7 Août	I7 août
Rapport virosées/ saines (plantes taillées)	0,970	0,8I6	0,838	0,669	0,684	0,8I2	0,825
Rapport virosées/ saines (plantes non taillées)	I,8I6	I,076	0,777	0,553	0,702	0,749	0,750

TABLEAU V

Nb.de jours entre repiquage & inoculation	Stade végétatif au moment de l'inoculation	Symptômes généraux (notation 50 jours après repiquage)	Symptômes à l'intérieur de la tige.	Aspect des la racines
4	3-4 feuilles	nécrose de la feuille infectée, rabougrissement de la plante, mosaïque aucuba très accusée du feuillage.	mœlle brunâtre	racines nécrosées en majorité.
14	7-8 feuilles	nécrose généralisée et mort des plantes	moelle entièrement noire.	racines entièrement nécrosées.
24	début de floraison.	nécrose de la feuille infectée et de wquelques cm.de branche.	quelques traces brunes dans la moelle.	quelques nécroses de racines
Témoin non inoculé	-	aucun symptômes	moelle d'un blanc pur	racines entièrement blanches

Nous avons cependant eu l'impression nette qu'au moment où les plantes taillées présentaient l'arrêt de croissance le plus marqué, l'émission de tiges latérales était fortement retardée chez les plantes virosées, alors qu'elle était à son maxiumu chez les plantes saines.

Cette émission de tiges latérales est très certainement incompatible avec de gros rendements précoces, notion universellement admise (et vérifiée par nos résultats - voir tableau III).

Si chez les plantes virosées la crise suivant la contamination réduit momentanément l'émission des tiges latérales elle peut favoriser dans une certaine mesure la fructification des premiers bouquets, ordinairement annulés au profit de la prolifération des tiges.

II. REACTIONS VARIABLES D'UNE VARIETE DE POIVRON A LA MOSAIQUE DU TABAC SUIVANT L'AGE DE LA PLANTE.

D'après le schéma classique de HOLMES (1), les réactions des diverses variétés de Capsicum annuum et C.Frutescens à la Mosaïque du Tabac sont gouvernées par trois gènes allèles, L, li et l.

Les constitutions génétiques LL, Lli et Ll entrainent une réaction par lésions locales analogue à celle de Nicotiana glutinosa. Les poivrons lili montrent une réaction nécrotique moins localisée qui s'étend aux nervures de la feuille inoculée et entraine sa mort; les hétérozygotes lil réagissent par une nécrose généralisée, les homozygotes récessifs ll, ne montrent pas de symptômes nécrotiques, mais seulement une mosaïque généralisée.

Les quelques essais que nous avons réalisés avec des variétés de poivrons françaises et des souches de Mosaïque du Tabac provenant de tomate, nous ont montré que les réactions nécrotiques étaient très fréquentes. Monsieur POCHARD a depuis vérifié ce fait sur un beaucoup plus grand nombre de lots. Il semblait de plus que l'extension de cette réaction nécrotique puisse varier avec l'age de la plante et atteindre sa gravité maximum au stade 7-8 feuilles.

Nous avons pratiqué, sous contre grillagée durant l'été I962, des inoculations artificielles échelonnées sur 2 variétés, Yolo Wonder (variété américaine de constitution génétique lili) et "Gros dur rouge" (variété locale, de constitution génétique inconnue).

Les plants ayant été repiqués le 2I Août au stade 2-3 feuilles ont été inoculés avec la souche aucuba du Professeur LIMASSET les 24 Août, 34 Septembre ou I4 Septembre, suivant les cas.

Sur la variété Yolo Wonder, on a observé dans tous les cas, la nécrose et la chute de la feuille infectée. La croissance ultérieure des plantes a toujours été normale. Le tableau V résume les observations réalisées sur la variété sensible.

Pour les deux premières dates d'inoculation, ce comportement reproduit ce que nous avions observé à plusieurs reprises en serre, non seulement avec la souche "Auuuba LIMASSET" mais avec des souches vertes communes provenant de tomate.

De telles variations dans la sensibilité des plantes avec l'age avaient été déjà mises en évidence pour le Blé par VINCENT (sensibilité à la rouille), pour le Maïs par MOLLOT (sensibilité à l'Helminthosporium). L'exemple des poivrons semble montrer qu'il peut en être de même vavec les virus Si dans le cas présent on raisonne en terme de "toxine", en supposant chez le poivron des mécanismes analogues à ceux que GRISON a mis en évidence chez N.glutinosa, on pourrait semble-t-il, admettre que la production de toxine devienne de plus en plus rapide et de plus en plus importante à mesure que la plante avance en age.

(1) HOLMES F.O. 1937. Inheritance of resistance to tobacco mosaic disease in the pepper. PHYTOPATH.27.pp.637.642.

.III. MOSAIQUE DU TABAC ET MOSAIQUE DE LA TOMATE.

Un récent travail de L.BROADBENT (1) portant sur 203 échantillons de tomates mosaïquées tend à montrer que les souches de mosaïque du tabac présentes en Angleterre sur tomate ne sont presque jamais du même type que celles qu'on peut trouver dans le tabac à cigarette et à pipe. L'hote différentiel utilisé par BROADBENT est un tabac "White Burley", d'origine hollandaise, qui donne des lésions locales avec les souches provenant de tomate, une mosaïque systémique avec les souches provenant de tabac.

A plus petite échelle, nous avons voulu voir si dans une région où l'on cultive dans les mêmes exploitations tabac et tomates, (environs de Marmande), les souches de mosaïque du tabac présentes sur les deux hôtes étaient ou non de nature différente.

L'un d'entre nous a collecté dans la région de Marmande durant le mois d'Août, 8 échantillons de feuilles de tomates (variété Merveille des Marchés) et 8 de feuilles de tabac (variété Paraguay) présentant des symptômes de mosaïque, chez plusieurs cultivateurs.

Les feuilles ont été séchées et conservées en herbier jusqu'en Décembre 1962.

TABLEAU VI.

	N.GLUTINOSA		N.TABACUM VAR.PARAGUAY		N.TABACUM VAR.SAMSUN	
	Symptômes sur la feuille inoculée.	Symptômes ggénéraux	Symptômes sur la feuille inoculée	Symptômes généraux	Symptômes sur la feuille inoculée	Symptômes généraux
8 échantillons provenant de tomates (Marmande	lésions locales	néant	lésions locales	néant	néant	mosaïque
8 échantillons provenant de tabac (Marmande)	lésions locales	néant	néant	mosaïque	néant	mosaïque
Souche Aucuba du Professeur LIMASSET	lésions locales	néant	lésions locales	parfois nécrose généralisée.	taches jaunatres non nécrotiques	mosaïque aucuba
Souche verte commune provenant de tomate (Vaucluse)	lésions locales	néant	lésions locales	néant	néant	mosaïque

Elles ont été alors mises à macérer 24 h. dans l'eau, passées au mixer dans l'eau de trempage, et la suspension obtenue a été inoculée à des Nicotiana glutinosa et à des tabac Pabaguay et Samsun. Nous avons ajouté aux échantillons Marmandais deux souches en usage courant dans notre laboratoire.

Les résultats ont été les suivants :(voir Tableau VI).

Nos résultats sont donc exactement parallèles à ceux de BROADBENT, le tabac Paraguay jouant, comme le White Burley de cet auteur, le rôle d'hote différentiel pour les souches "tabac".

Seule, la souche "Aucuba LIMASSET" a un comportement particulier puisqu'elle peut dans certains cas provoquer une nécrose généralisée sur le tabac Paraguay. Du point de vue pratique, on peut supposer que la mosaïque du tabac et celle de la tomate ont dans la région de Marmande des épidémiologies indépendantes.

(1) L.BROADBENT.1962. The epidemiology of tomato mosaic. II.Smoking tobacco as a source of virus. ANN.OF APPLIED BIOLOGY.50.pp.461.466.

-:-:-:-:-

LE PROBLEME DU DIAGNOSTIC PRECOCE DES VIRUS DE LA POMME DE TERRE CULTIVEE AU CHAMP

- Etude de la migration du virus X dans la feuille de Pomme de terre

H. AUGIER DE MONTGREMIER et J. ALBOUY

INTRODUCTION

Le plan de la sélection généalogique de la Pomme de terre a subi d'importantes modifications au cours de l'année 1962. Une innovation importante a été la constitution d'une pépinière de têtes de famille, résultant de la plantation dans un seul champ de 5.000 tubercules des meilleures provenances. La première année, il était inévitable que des problèmes nouveaux surgissent. En effet c'est la première fois que l'on effectue à une aussi grande échelle, le diagnostic sérologique des virus sur du matériel prélevé au champ. Le feuillage de chacune des plantes issues des 5.000 tubercules est contrôlé sérologiquement, et pour cela on prélève une feuille sur chaque pousse. Avant d'effectuer ces épreuves, on s'était déjà posé bien des questions de façon à arrêter un programme technique convenable. Quelle est la période favorable pour ce diagnostic ? Comment faut-il prélever le matériel foliaire ?

Un mois seulement après la plantation des 5.000 tubercules les techniciens du laboratoire de Landerneau, Mrs LE HIR et LE CORRE, pouvaient faire des observations importantes. La détection des 4 principaux virus de la Pomme de terre est à cette date de valeur tout à fait inégale. Elle est très bonne pour le virus X, moyenne à faible pour les virus S et M, nulle pour le virus Y. Il faut donc tenir compte de la rapidité de multiplication de chacun des virus, pour fixer la date du contrôle sérologique, et prévoir plusieurs séries d'épreuves échelonnées dans le temps. D'autre part, les symptômes du virus Y apparaissent souvent au moment où la réaction sérologique devient positive. Dans ce cas, la méthode sérologique perd de sa sensibilité. Enfin l'accroissement de la surface foliaire est tel que si l'on extrait le jus de plusieurs feuilles à la fois, on est tenté de broyer uniquement les folioles terminales qui sont très développées. Mais on ne sait pas à priori si ces folioles terminales sont envahies les premières lors d'une contamination au champ.

Il nous a paru intéressant d'étudier plus spécialement deux problèmes :

- La sensibilité de la méthode sérologique pour la détection précoce du virus Y au champ.

- La migration des virus dans la feuille composée de Pomme de terre.

Pour l'étude du ler problème, il nous faudra attendre la période normale de végétation de la Pomme de terre. Une de nos hypothèses de travail est que la rapidité de multiplication du virus Y pendant la période d'incubation doit être insuffisante pour maintenir un taux de virus décelable par la méthode sérologique. Pour vérifier cette hypothèse, il faut donc établir une courbe de variation du taux de virus dans la plante pendant la période d'incubation, à l'aide d'un méthode de dosage physique ou biologique plus sensible que la méthode sérologique.

ETUDE DE LA MIGRATION DU VIRUS X DANS LA FEUILLE COMPOSEE DE POMME DE TERRE

1 - Importance de la migration des virus sur leur diagnostic.

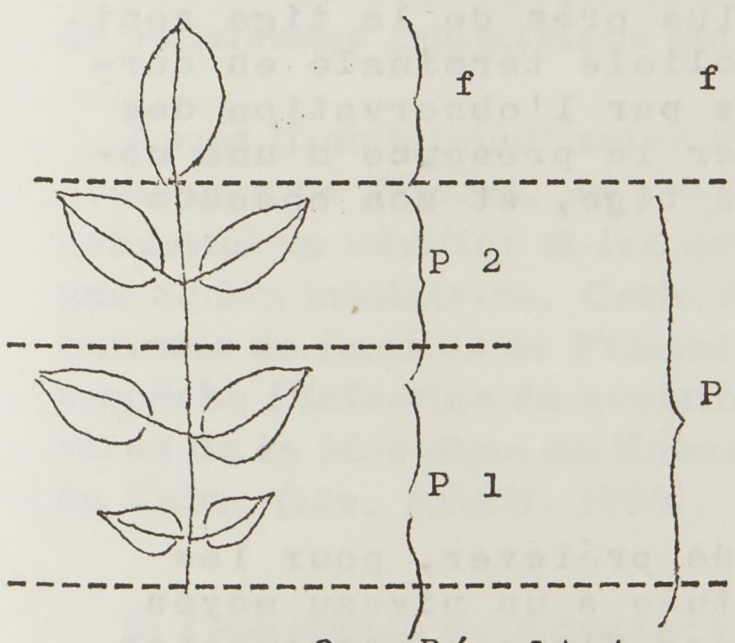
Les contaminations des pieds de Pomme de terre au champ peuvent provenir du tubercule mère infecté, ou être provoquées par des facteurs externes : contact des plantes saines et malades - manipulations de l'homme, transmission par un insecte vecteur. Dans le premier cas, tous les organes de la plante naissent infectés. Dans le second, on assiste à une migration du virus, à la fois vers le sommet de la plante et l'appareil souterrain, à partir de la feuille qui a été inoculée. De toute manière, toutes ces plantes malades doivent être éliminées le plus tôt possible de façon à éviter la contamination des autres têtes de famille. Pour déceler une contamination récente au champ, il faut donc prélever un organe envahi. Si l'on connaît bien le trajet du virus dans la plante, depuis les études de SAMUEL (1934) sur la Tomate, notamment, par contre, il ne semble pas que l'on ait suivi avec précision la progression du virus dans une feuille composée - c'est pourquoi nous avons voulu suivre le mouvement du virus X dans des boutures de Pomme de terre, et analyser par fragment les feuilles au cours de leur envahissement.

2 - Matériel et méthode

Nous avons utilisé 24 plantes monotiges de la variété Ackersegen, provenant du bouturage de jeunes pousses. Elles

étaient en pleine croissance, et comportaient au moment de leur inoculation 8 à 9 feuilles bien développées. On a tout d'abord vérifié sérologiquement qu'elles ne renfermaient pas de virus X. Puis on a inoculé mécaniquement avec ce virus la foliole terminale de la 4ème feuille comptée à partir de la base.

D'après le résultat des épreuves sérologiques, 11 jours plus tard le virus avait migré au sommet des plantes, tandis qu'il fallait environ 18 jours pour qu'il atteigne les racines, et les feuilles les plus âgées. Le mouvement du virus était donc beaucoup plus rapide vers le sommet, en direction des organes en voie de croissance active. Puis les diverses feuilles ont été envahies les unes après les autres, à partir du sommet, par un mouvement descendant du virus. Une nouvelle feuille était envahie tous les 2 ou 3 jours, suivant la température de la serre. Pour suivre la migration du virus, dans la feuille elle-même, il a fallu s'assurer tout d'abord que la feuille située immédiatement au dessus de la feuille à analyser était totalement envahie. Ensuite on découpait en fragments la feuille à analyser suivant le schéma ci-contre. Le pétiole était toujours écarté. La première paire de folioles est insuffisamment développée pour être broyée seule. On analysait donc généralement la foliole terminale (f), la paire de folioles située immédiatement au-dessous (p2) et les 2 autres paires (p1). Dans le cas de feuilles très peu développées, on analysait simplement les 2 parties F et P.



3 - Résultats

Dans les cas les plus spectaculaires, c'est-à-dire, lorsque l'analyse des feuilles était faite au moment précis de leur envahissement, nous avons obtenu les résultats suivants :

Réactions sérologiques

pied n°	Feuille n°	f	P2	P1	date
1	F 7	-	E	E	16-10
	F 6	E	E	++	19-10
3	F 7	++	+++		16-10
	F 6	-	+	+	19-10
5	F 7	+	++		12-10
	F 6	E	++	++	15-10
	F 4	-	++	+++	29-10
12	F 10	+	++		12-10
	F 9	+	+++		15-10
	F 8	E	E	++	16-10

E : réaction très faible

Les folioles situées les plus près de la tige sont donc envahies les premières, et la foliole terminale en dernier. Ces résultats ont été confirmés par l'observation des symptômes, car nous avons pu remarquer la présence d'une mosaïque sur les folioles proches de la tige, et son absence sur la foliole terminale.

CONCLUSION

On conseille généralement de prélever, pour les examens sérologiques, une feuille située à un niveau moyen de la plante. Il semble que dans le cas d'une contamination récente, le prélèvement doit être effectué différemment. Il vaudrait mieux prélever des feuilles proches du sommet, et broyer de préférence les folioles situées près de la tige.

EFFET INHIBITEUR DES EXTRAITS DE SEMENCE DE PIMENT SUR LE VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC.

J.M. FELDMAN (1)
Ingénieur Agronome de la Faculté d'Agronomie de MENDOZA.

-:-:-

I. - Introduction : Pour mettre en évidence les virus présents dans la graine, une méthode généralement employée, consiste à broyer les graines entières, ou seulement par parties, dans un tampon, et à se servir du jus exprimé pour inoculer des plantes hôtes.

Cette technique appelle deux remarques : la première, assez évidente, est que la concentration initiale du virus dans la semence, déjà faible, est encore abaissée par l'extraction dans le tampon. Les chances d'isoler le virus diminuent. La seconde, est la possibilité d'existence dans la graine de substances inhibitrices qui agissent in vitro au moment du broyage.

Ayant l'intention d'isoler et d'identifier les virus présents dans des semences de Piment, en provenance d'Argentine, il nous a paru tout d'abord essentiel de vérifier si les extraits de semence de cette plante avaient ou non une action inhibitrice. Cette éventualité était d'autant plus probable que les extraits de feuilles de Piment renferment une substance thermolabile qui empêche l'infection de certaines plantes par le virus I du Concombre, le virus de la Mosaïque du Tabac, du " Tobacco etch " et du " Ring spot " du Tabac (Mc. KEEN, 1956).

Si l'existence de substances inhibitrices a été principalement montrée dans les extraits de feuilles (BAWDEN, 1954), par contre les exemples d'inhibiteurs présents dans des extraits de semence sont très rares. On peut citer les travaux de CHEO (1955), qui a démontré l'effet inhibiteur de

.../...

---

(1) - Boursier du "Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Tecnicas de la Republica Argentina".

Ce travail a été effectué à la Station Centrale de Pathologie Végétale, au laboratoire de Melle H. AUGIER de MONTGREMIER.

l'extrait de semence de haricot sur le virus du "Southern bean mosaic virus" et de CROWLEY (1955) qui a mis en évidence la présence d'inhibiteurs, du virus I du Concombre dans la graine de Concombre, et du virus de la mosaïque du Tabac dans la graine de Tabac.

Les essais préliminaires que nous avons effectués en trempant des graines de Piment dans des suspensions de virus de la mosaïque du Tabac, ont montré une puissante inhibition du pouvoir infectieux de ce virus, tant sur N.tabacum, var Xanthi que sur N. glutinosa. Cette inhibition était comprise entre 97 et 100%. L'emploi d'un agent réducteur, comme le sulfite de sodium, ou d'autres produits tels que le diethyl dithiocarbamate de sodium, n'ont eu aucune influence. C'est pourquoi, il nous a paru intéressant d'étudier de façon plus approfondie l'action de ces extraits sur le virus de la mosaïque du Tabac.

II. - Matériel et Methode :

Les graines de Piment (Capsicum annuum L. var. "Perfection") ont été récoltées à MENDOZA au mois d'Avril 1962. Il s'agit d'un lot de semences commercial. Sauf dans nos essais préliminaires, les extraits ont toujours été obtenus de la manière suivante : 4 gr de graines sont broyés dans un mortier après trempage dans 10 cm^3 d'un tampon phosphate à pH = 7, pendant la nuit. On ajoute 10 cm^3 de tampon, au cours du broyage. Le broyat est filtré sur étamine, et le résidu éliminé. Le liquide obtenu est utilisé tel quel (extrait brut) ou centrifugé 15 min. à 6.000 t (extraitcentrifugé). Le pH de cet extrait est de 6,7.

Le même procédé a été employé pour obtenir des extraits de différentes parties de la graine : tégument - albumen et embryon. Pour cette séparation, la dissection des graines a pu être réalisée à sec à l'aide d'une aiguille lancéolée introduite dans le micropyle.

Nous avons ajouté à ces extraits, des jus centrifugés de Tabac Samsun infecté par la souche ordinaire du virus de la Mosaïque du Tabac, tels quels, ou dilués dans le tampon phosphate (0,1 M à pH = 7). Nous avons choisi le virus de la Mosaïque du Tabac pour cette étude, car il est très stable, et se prête facilement à des tests quantitatifs du pouvoir infectieux. D'autre part, on sait que la plupart des inhibiteurs d'infection ne sont pas spécifiques, et que les résultats obtenus avec le virus de la Mosaïque du Tabac se retrouvent pour d'autres virus.

Nous avons inoculé trois hôtes hypersensibles : N. tabacum var. Xanthi, N. glutinosa et Phaseolus vulgaris var, Pinto, par demi feuille, sauf dans le cas des haricots où les deux feuilles cotylédonnaires de même âge

.../

pouvaient être utilisées, l'une pour le témoin, et l'autre pour la préparation à étudier.

III. - Résultats des essais : (2)

A - Vérification de la présence d'un inhibiteur.

1 - Evaluation du taux d'inhibition.

Nous avons laissé en contact pendant 2 heures, à la température du laboratoire, 7 cm^3 d'extrait brut, auquel on a ajouté 0,cc 5 d'une préparation de virus au 1/10e. L'inhibition mesurée par la méthode de l'inoculation de demi-feuilles de Tabac Xanthi, était comprise entre 98,5% et 100 %. Des résultats semblables ont été obtenus avec l'extrait centrifugé.

Nous avons également mis en comparaison l'effet inhibiteur des extraits de semence d'une autre solanée : la Tomate. Les extraits de graines de la var. "Marmande", se sont également montrés très inhibiteurs mais à un degré moindre (90%).

2 - Rapidité d'action.

Une des propriétés caractéristiques des inhibiteurs, permettant de les distinguer des inactivateurs, est leur capacité d'agir immédiatement. C'est pourquoi, il nous a paru essentiel de mesurer le temps de la réaction en laissant en contact 1cc,9 d'extrait brut et 0 cc,1 de virus au 1/10e de quelques secondes à 2 heures. L'effet est instantané, et les résultats ne sont pas modifiés par un repos prolongé du mélange.

3 - Action sur le virus :

a) Conservation du pouvoir antigénique.

Cette vérification a été faite dans un mélange à volumes égaux d'extrait brut, et de jus de Tabac malade centrifugé, après un contact de 2 heures. La

.../...

(2) - Nous remercions vivement Mme ALBOUY de l'aide qu'elle nous a apportée dans la réalisation de certains de nos essais.

réaction sérologique a pu être réalisée après clarification du mélange par centrifugation et filtration sur papier. La précipitation avec un serum anti MT au 1/10e a été aussi intense dans le mélange que dans la préparation de virus au 1/2. Le pouvoir antigénique du virus n'est donc pas altéré, mais cette constatation ne suffit pas à démontrer l'existence d'un inhibiteur. Il faut également montrer que le virus ne perd pas son pouvoir infectieux. On sait en effet que le virus peut être inactivé in vitro, tout en conservant ses propriétés sérologiques.

b) Conservation du pouvoir infectieux.

Nous avons relargué avec du sulfate d'ammonium le virus présent dans le mélange avant de l'inoculer à N. Xanthi. Le mélange comprenait 5cm3 d'extrait brut et 5 cm^3 de virus de la Mosaïque du Tabac au 1/10e. Après les opérations de centrifugation, filtration, et élimination d'une partie surnageante graisseuse, le volume total n'était plus que de 6 cm^3,5. Pour faciliter les opérations de relargage dans un milieu assez dense et éviter des entrainements mécaniques, nous avons dilué la préparation, puis précipité le virus en ajoutant 1/4 de son volume d'une solution saturée de $SO_4(NH_4)_2$. Le culot de centrifugation a été repris par 6cc,5 de tampon. Les résultats des inoculations sur Xanthi ont indiqué clairement que le virus ne perdait pas son pouvoir infectieux et que la récupération du virus était très bonne (moyenne du nombre de lésions : virus purifié 92,3 - Témoin 91,7).

c) Effet de la dilution :

Etant donné que le virus de la Mosaïque du Tabac n'est pas inactivé in vitro par l'extrait brut, on peut essayer de diminuer graduellement l'effet inhibiteur par des dilutions successives du mélange.

Le nombre très faible de plantes dont nous disposions pour cet essai, ne nous a pas permis d'obtenir des résultats ayant une valeur statistique, et d'établir une courbe valable du pouvoir infectieux en fonction de la dilution du mélange. Néanmoins, nous avons pu constater pour les dilutions : 1/2 - 1/100 - et 1/2000, une augmentation progressive du pouvoir infectieux : 5,5% - 41,1% - et 78,6% (% de lésions du Témoin).

B - Mécanisme de l'inhibition.

1 - Application de l'inhibiteur avant et après l'inoculation.

Nous avons appliqué l'extrait brut au pinceau, à la face supérieure de demi-feuilles de N. glutinosa, 2h avant l'inoculation et 30 min., 1 h, 2h, et 5 h après l'inoculation. La moitié traitée a été lavée aussitôt avant l'inoculation dans le 1er cas, et 2 h après application de l'extrait dans le second.

.../..

L'application de l'extrait 2 h avant l'inoculation a donné un taux d'inhibition de 90%, tandis que dans les autres cas, il était nul.

On pourrait donc conclure de ces essais que l'inhibiteur agit seulement sur l'installation du virus, et non sur sa multiplication.

2 - Migration des facteurs d'inhibition dans l'épaisseur de la feuille.

L'application de l'extrait brut au pinceau à la face inférieure des feuilles de N. glutinosa 24h avant l'inoculation, a donné un taux d'inhibition de 60%, montrant qu'il y a une migration, ou du moins une action à distance des facteurs d'inhibition d'un épiderme à l'autre. La substance inhibitrice agit donc indépendamment du virus, sur la plante hôte en modifiant sa susceptibilité, et non pas sur les particules de virus elles-mêmes.

Les applications effectuées 2h et 30 min. avant l'inoculation, en même temps ou 30 min. après l'inoculation, n'ont provoqué aucun effet inhibiteur. Sans chercher à approfondir le mécanisme de l'action de l'inhibiteur, qui pendant ce laps de temps peut modifier le métabolisme de l'hôte, ou migrer d'un épiderme à l'autre, on peut dire dans ce cas que l'inhibiteur agit sur l'installation du virus, et non sur sa multiplication. Mais pour en être vraiment sûr, il faudra effectuer de nouveaux essais avec des hôtes sensibles.

3 - Influence de la plante - hôte.

Etant donné que l'inhibiteur n'affecte pas le virus lui-même et que son effet dépend de l'hôte employé, nous avons inoculé une nouvelle plante-hôte : Phaseolus vulgaris, var. Pinto - Notre choix aurait pu se porter sur une plante pour laquelle le phénomène d'inhibition n'ait pas lieu. En fait les résultats ont été du même ordre (100% d'inhibition) que ceux observés avec N. Xanthi, et N. glutinosa. Dans un nouvel essai, il faudra inoculer le Datura stramonium.

C - Localisation.

Nous avons disséqué des graines sèches de Piment de façon à séparer le tégument, de l'albumen + embryon. Il était intéressant de constater si l'inhibiteur était réparti dans toute la graine, ou présent dans une partie seulement. On pouvait également se demander si l'extrait de la toute jeune plantule avait déjà des propriétés inhibitrices, et si les propriétés de l'inhibiteur qu'elle contenait étaient les mêmes que celui de la graine ou des feuilles.

Nous avons donc fait germer 40 graines sur du coton humide dans des boîtes de Pétri placées tout d'abord dans une étuve à 28° pendant 5 jours. Ensuite

.../...

nous les avons transportées dans une armoire vitrée, éclairée à la température du laboratoire. Les 40 plantules âgées de 15 jours ont été broyées au mortier en présence de 2 cm^3 de tampon, le broyat passé sur étamine.

Les résultats sont les suivants :

	% d'inhibition.
extrait brut :	97,5 %
Tégument	98,9 %
Albumen + embryon	99,7 %
Jeune plantule	98,8 %

L'inhibiteur est donc présent dans toute la graine. Pour savoir si l'inhibiteur de la jeune plantule est la même que celui des feuilles ou des graines, il faudra déterminer sa résistance à la chaleur ainsi que son effet sur l'hôte : N. glutinosa.

D. - Etude de quelques propriétés de l'inhibiteur.

I . - Action de la température.

Nous avons chauffé au bain-marie à 80° pendant 10 min., et à 100° pendant 10 min. - 30 min 1 h et 2 h, des échantillons de 1,cc9 d'extrait brut placés dans des tubes à hémolyse fermés. Immédiatement après le traitement par la chaleur, les tubes ont été refroidis par un courant d'eau froide. Chaque échantillon a été mélangé à 0,1 cc de virus au 1/10e et inoculé 2 h après à des demi-feuilles de Tabac Xanthi. Dans tous les cas l'inhibition était totale (100 %), ce qui montre bien que l'inhibiteur est hautement résistant à la chaleur. Il supporte une température de 100° pendant 2 h.

Il est intéressant de noter que l'inhibiteur d'infection trouvé par Mc KEEN dans le jus de feuilles de Piment est détruit à pH = 7 en 10 min. à 90°. Ses propriétés semblent donc être différentes puisque en outre il n'empêche pas l'infection du virus de la Mosaïque du Tabac sur D. stramonium et N. glutinosa.

2 - Longévité in vitro et résistance à la dessication.

L'extrait brut a conservé toute son activité (97% d'inhibition) après 5 jours de conservation à la température du laboratoire. De même un extrait séché à l'air libre dans le fond d'une boîte de Pétri, et repris par le volume initial d'eau distillée était encore actif (97% d'inhibition) 5 jours après l'évaporation. Ces résultats ont été obtenus par inoculation de Tabac Xanthi et N. glutinosa.

.../....

IV. - R E S U M E.

Ces premiers essais ont montré, pensons nous, que les extraits de graines de Piment, renferment un inhibiteur du virus de la Mosaïque du Tabac. En effet ce virus conserve son pouvoir infectieux et son pouvoir antigénique après avoir été mis au contact de l'extrait, et peut être récupéré en quasi totalité par relargage avec du $SO^4 (NH^4)^2$.

La dissection de la graine a montré que l'inhibiteur se trouve à peu près à la même concentration tant dans les téguments, que dans l'albumen auquel reste adhérent l'embryon.

Il s'agit d'un inhibiteur d'infection empêchant l'installation du virus dans la plante. Son action sur l'hôte peut être démontrée lorsqu'on l'applique à la face inférieure de la feuille indépendamment du virus. En présence du virus l'effet est immédiat, et diminue progressivement avec la dilution du mélange.

La substance inhibitrice est thermostable (supporte une t° de 100°, pendant 2 h.), ce qui la différencie nettement de l'inhibiteur trouvé par Mc. KEEN dans les extraits de feuilles.

Cette étude encore incomplète doit être poursuivie. Il nous faut reprendre l'essai de dilution du mélange (inhibiteur + virus) avec un nombre beaucoup plus élevé de plantes, de façon à obtenir des résultats ayant une valeur statistique, et celui des effets de l'inhibiteur sur la multiplication du virus avec des hôtes sensibles.

Enfin, divers problèmes mériteraient d'être abordés tels que celui de la nature chimique de l'inhibiteur, les propriétés spéciales de l'inhibiteur des graines et de l'inhibiteur des feuilles, qui ne semblent pas être les mêmes, enfin la caractérisation de l'inhibiteur de la jeune plantule.

-:-:-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-=-=-=-

BAWDEN, F.C., 1954 - "Inhibitors and plant viruses ". Advances in virus research. Vol.II.
Academic Press ,Inc., NEW-York.pp. 32-55.

CHEO, Pen CHING, 1955. - "Effect of seed maturation on inhibition of Southern bean mosaic virus in bean".
Phytopath., 45 : 17-21.

CROWLEY, N.C., 1955. - "The effect of seed extracts on the infectivity of plant viruses and its bearing on seed transmission".
Australian J. of Biological Sc., 8 : 56-67.

Mc KEEN, C.D. , 1956. - "The inhibitory activity of extract of Capsicum frutescens on plant virus infections".
Canadian J. of Botany, 34 : 891-903.

COMPARAISON DE L'ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE DE POMMES DE TERRE SAINES ET ATTEINTES D'ENROULEMENT

D. SPIRE et M.C. BRAEM

Dans le but de trouver un test biochimique simple permettant d'identifier le virus de l'enroulement de la pomme de terre sur feuille, germe ou tubercule, nous avons entrepris une étude des enzymes liés directement au métabolisme des acides nucléiques. Si le virus de l'enroulement se présente sous une forme que l'on peut appeler "acide nucléique libre " (1) nous avions pensé qu'il pourrait exister entre des pommes de terre saines et enroulées des variations dans la quantité d'enzymes se rattachant soit à la synthèse soit à la destruction d'acide nucléique.

Nous avons commencé cette étude par le dosage de la ribonucléase.

METHODE

Pour analyser les variations de ribonucléase entre plantes saines et malades, en mélange à 1cc d'une solution d'acide ribonucléique de levure à 8 mg/cc dissoud dans un tampon tris-citrique pH 7 0,2 cc d'un extrait de la plante à analyser, extrait broyé au mortier et pressé sur étamine après congélation. Ce mélange est ensuite chauffé au bain-marie pendant 25 minutes à 50 degrés c, puis refroidi rapidement. Un prélèvement de 0,1 cc est alors placé en électrophorèse sur plaque de gélose 1 % dans un tampon acéto acétate N/10 pH 5. La gélose est colorée par de l'acridine orange 1/10.000 (2). On effectue la migration à 110 V, 100 mA pendant 1 heure. L'acide nucléique de levure qui n'a pas été détruit par la ribonucléase de l'extrait de plante migre vers l'anode, offrant une fluorescence jaune par observation directe en lumière ultraviolette, fluorescence dûe au complexe avec l'acridine orange. La méthode est pour l'instant qualitative, mais peut-être rendue quantitative par fluorométrie.

.../...

... ...

Activité ribonucléasique dans des feuilles de pommes de terre, selon le niveau foliaire.

Pour nous placer dans les conditions les meilleures, nous avons tout d'abord étudié l'activité ribonucléasique d'une plante saine et d'une plante malade selon le niveau foliaire.

Nous avons constaté que cette activité allait croissant de la base au sommet de la plante, ceci de façon continue, que la plante soit saine ou atteinte d'enroulement.

Par la suite, nous avons utilisé pour comparer l'activité des plantes saines et malades, un niveau de feuilles assez bas, niveau où les symptômes d'enroulement sont apparents sur la plante malade.

Comparaison de l'activité ribonucléasique entre plantes saines et malades.

Les expériences ont été effectuées sur pommes de terre, variété Ultimus, saines et malades, traitées à la rindite et dont la croissance s'est réalisée en serre dans des conditions de lumière et températire absolument identiques.

Les plantes présumées saines étaient dépourvues de symptômes, les plantes malades présentaient un enroulement des feuilles de base et un léger jaunissement du feuillage.

Chaque expérience réalisée mettait en présence une plante saine et une plante malade, de taille et de végétation la plus voisine possible.

Les expériences ont été réalisées sur 54 plantes (27 saines et 27 enroulées) et nous ont donné les résultats suivants :

23 tests ont montré une activité ribonucléasique plus intense dans la plante saine que dans la plante malade c'est-à-dire une fluorescence en U.V. plus intense chez la plante malade.

2 tests n'ont montré aucune différence.

2 ont présenté une réaction inverse, c'est-à-dire une plus grande activité ribonucléasique chez la pomme de terre enroulée.

Il semble donc qu'il y ait une différence importante de comportement en ce qui concerne la ribonucléase entre plante saine et plante enroulée, la plante malade montrant une activité ralentie de cet enzyme. Il est intéressant de savoir

.../...

si cette perturbation de métabolisme existe dans les autres parties de la plante malade, en particulier dans les germes qui donnent un matériel beaucoup plus homogène que la feuille. Il semble, d'après les premières expériences réalisées, que des différences allant dans le même sens que précédemment puissent être obtenues avec des germes très courts.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1) P. CORNUET, D. SPIRE & J. QUEMENER Virologie Appliquée 1961 n°2 p.57-60

2) P. CORNUET & S. ASTIER-MANIFACIER C.R.Acad.Sci.1962,265 p,1660

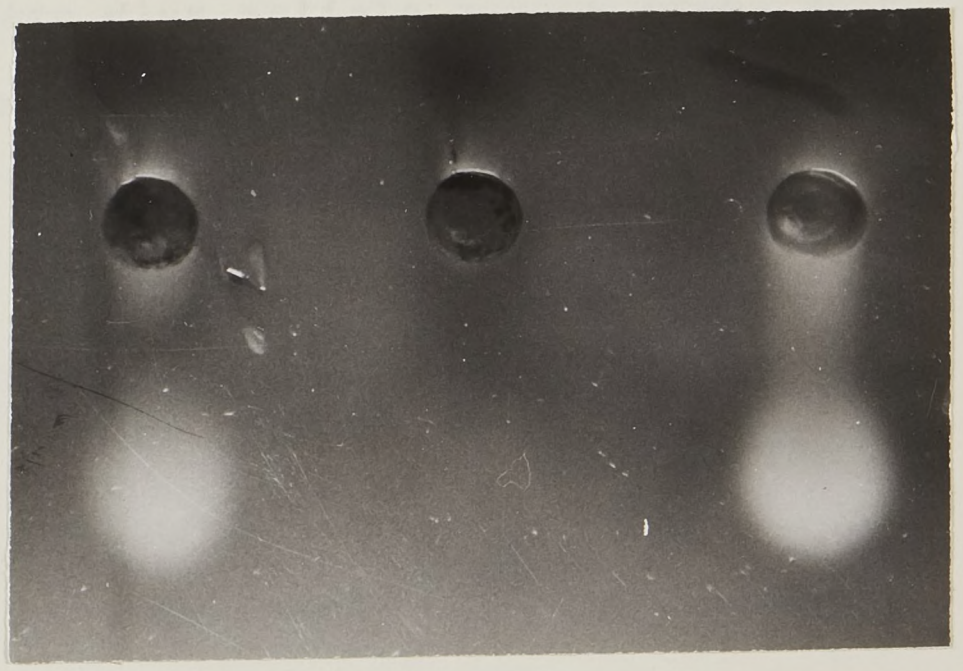


Photo : Electrophorèse en gélose acridine

à gauche : Pomme de terre enroulée

au Centre: Pomme de terre saine

à droite : A.R.N. témoin

ASPECTS MORPHOLOGIQUES DE LA CHLORANTIE DU COLZA

par G. MORVAN

Dans une note à l'Académie d'Agriculture de France(1) nous avons signalé en 1958 les résultats positifs obtenus au cours d'essais de transmission par greffe d'une anomalie du Colza comme depuis longtemps et habituellement désignée sous le nom de Chlorantie. Nous avons conclu de ces essais qu'il s'agissait d'une virose. Ceux-ci furent répétés l'année suivante avec autant de résultats.

Depuis cette époque la fréquence de cette maladie a diminuée, elle n'a plus guère été signalée depuis.

Nous avions réalisé un certain nombre de clichés photographiques qui n'avaient pu être publiés dans cette note. Comme nous n'avons pas rencontré de circonstances favorables à la poursuite de cette étude, nous avons pensé que, même en l'absence de données supplémentaires, la publication de certains de ces documents pourraient intéresser les lecteurs de Virologie appliquée.

Leur intérêt se trouve d'ailleurs accru par la présence dans ce numéro d'un article sur un virus du type jaunisse chez la tomate. La chlorantie du Colza en effet doit-être, semble-t-il, rattachée à ce type de maladie.

DESCRIPTION DE LA MALADIE

Nous reproduisons ici la description donnée dans la note publiée en 1958.

Au mois de Mai, les pieds malades se distinguent par leur taille légèrement supérieure à celle de plants sains, l'angle formé par des pédoncules floraux avec l'axe de l'inflorescence est très aigü, et les boutons floraux sont presque sphériques au lieu d'être allongés comme chez les plantes normales.

Les fleurs dont le périanthe est de dimension inférieure à la normale, ont un aspect aberrant. Les pétales se montrent sous l'aspect de petites languettes vertes. Les étamines sont parfois dépourvues d'anthères et se réduisent alors à un filet souvent élargi. L'ovaire manifeste également des caractères nettement tératologiques plus ou moins accentués.

.../...

(1) - La chlorantie, maladie à virus du Colza.
C.R. Académie Agriculture 44 . 505-507, 1958

La plupart du temps, atteint d'un gigantisme remarquable, il s'allonge. Il présente des boursouflures plus ou moins accentuées et se recourbe au lieu de rester rectiligne. Il est, de plus, aplati perpendiculairement à la fausse cloison, tandis que l'ovaire normal est aplati parallèlement à celle-ci. Les placentas forment alors un double sillon relativement profond à sa surface. Sur la section on reconnait un développement à peu près normal de la région placentaire, tandis que les tissus voisins sont hypertrophiés.

Il arrive en outre que l'ovaire déformé soit porté par un gynophore de 1 à 4 centimètres de longueur, surmontant la double collerette verte du calice et de la corolle. L'irrégularité de cette hypertrophie provoque la formation de fentes. Enfin les ovules sont fixés au placenta par des funicules susceptibles d'atteindre 1 à 2 millimètres. Dans certains cas, l'ovaire dégénère complètement et se réduit à deux pièces foliacées opposées l'un à l'autre, entourant un petit organe ramifié et trapu couvert de papilles jaunâtres.

Ces anomalies peuvent apparaître avec un certain retard. les fleurs anormales sont alors localisées, soit au sommet et surmontent généralement des siliques normales, soit uniquement sur des pousses latérales.

COMMENTAIRES SUR LES ILLUSTRATIONS.

Figure 1 - Inflorescence composée de fleurs anormales de forme globuleuse.
Figure 2 - Inflorescence portant des fleurs dont les ovaires sont plus ou moins développés. A la base, siliques presque normales, au sommet ovaires renflés ou ouverts.
Figure 3 - Allongement de la base de l'ovaire. Celui-ci tend à se transformer en bouton floral. Multiplication des pièces du perianthe.
Figure 4 - Allongement de l'ovaire. Prolifération des tissus dans le sens perpendiculaire à la fausse cloison. Un sillon se forme au niveau du placenta.
Figure 5 - Ouverture des parois de l'ovaire qui entourent 2 axes terminés par un renflement couvert de papilles.
Figure 6 - A gauche, ovaire fermé fortement déformé. A droite les parois de l'ovaire simulent deux feuilles opposées. Entre elles une petite tige ramifiée aux extrémités couvertes de papilles
Figure 7 - Départ d'une tige à l'aisselle d'un sépale.
Figure 8 - Prolifèration des pièces florales.
Figure 9 - Certaines fleurs présentent un ovaire rudimentaire. L'axe de la tige se termine par de courtes ramifications couvertes d'écailles et de papilles.

G.M.1

G.M.2

G.M.3

G.M.4

G.M.5

G.M.6

G.M.7

G.M.8

G.M.9

PREMIERES OBSERVATIONS RELATIVES A L'APPARITION DANS LA REGION PARISIENNE, DE MALADIES A VIRUS DE TYPE " JAUNISSE " SUR TOMATE

M.T. COUSIN

Jusqu'à ces dernières années on considérait en France la Mosaïque du Tabac comme la maladie à virus la plus dépressive pour la Tomate. Des jaunisses avaient été signalées depuis fort longtemps à l'étranger sous des noms divers ; " Big Bud " en Australie et en Amérique, "Leptomotropus Convolvuli" en Russie, "Stolbur" en Europe Centrale; Tchécoslovaquie, Hongrie, Autriche, Roumanie, Allemagne, Turquie, "Maladie des proliférations" en Suisse, "Virescenza ipertrophica" en Italie. A Montfavet, Pecaut, Messiaen et Laterrot ont observé, pour la première fois en France, durant l'été 1959, des Tomates présentant un aspect rabougri et violacé. En parcourant la région de Monthléry, à la fin de l'été 1962 nous avons remarqué l'importance de maladies à virus de ce type. Si certains champs en étaient totalement exempts, d'autres étaient infectés à des taux voisins de 50 %. Le plus fort pourcentage de plantes malades fut observé dans un champ de Tomates entouré de plantes ornementales variées (Chrysanthèmes, Dahlias, Capucines, Cosmos...) Les cultivateurs attribuaient souvent les symptômes observés à des dégâts de froid. Toutefois l'observation révélait une dispersion remarquable des plantes malades au champ.

II - ETUDE DE LA REPARTITION AU CHAMP DE TOMATES MARMANDE PRESENTANT DES SYMPTOMES DE MALADIES A VIRUS DE TYPE JAUNISSE.

Nous avons noté la répartition des Tomates malades dans un champ contenant un taux de 7% de plantes infectées. Les notations furent effectuées sur 12 lignes de 125 m de long, espacées de 80 cm. Les plantes sont placées tous les 50 cm sur la ligne. Seules les tomates présentant des symptômes violents sont représentées ici. (graphique 1).

La disposition très désordonnée des plantes malades suggère l'idée d'une transmission par un vecteur se déplaçant à des distances relativement grandes. Elle exclut l'hypothèse d'une maladie physiologique provoquée uniquement par des conditions de climat ou de nutrition défavorables. La maladie ne semble pas transmissible mécaniquement.

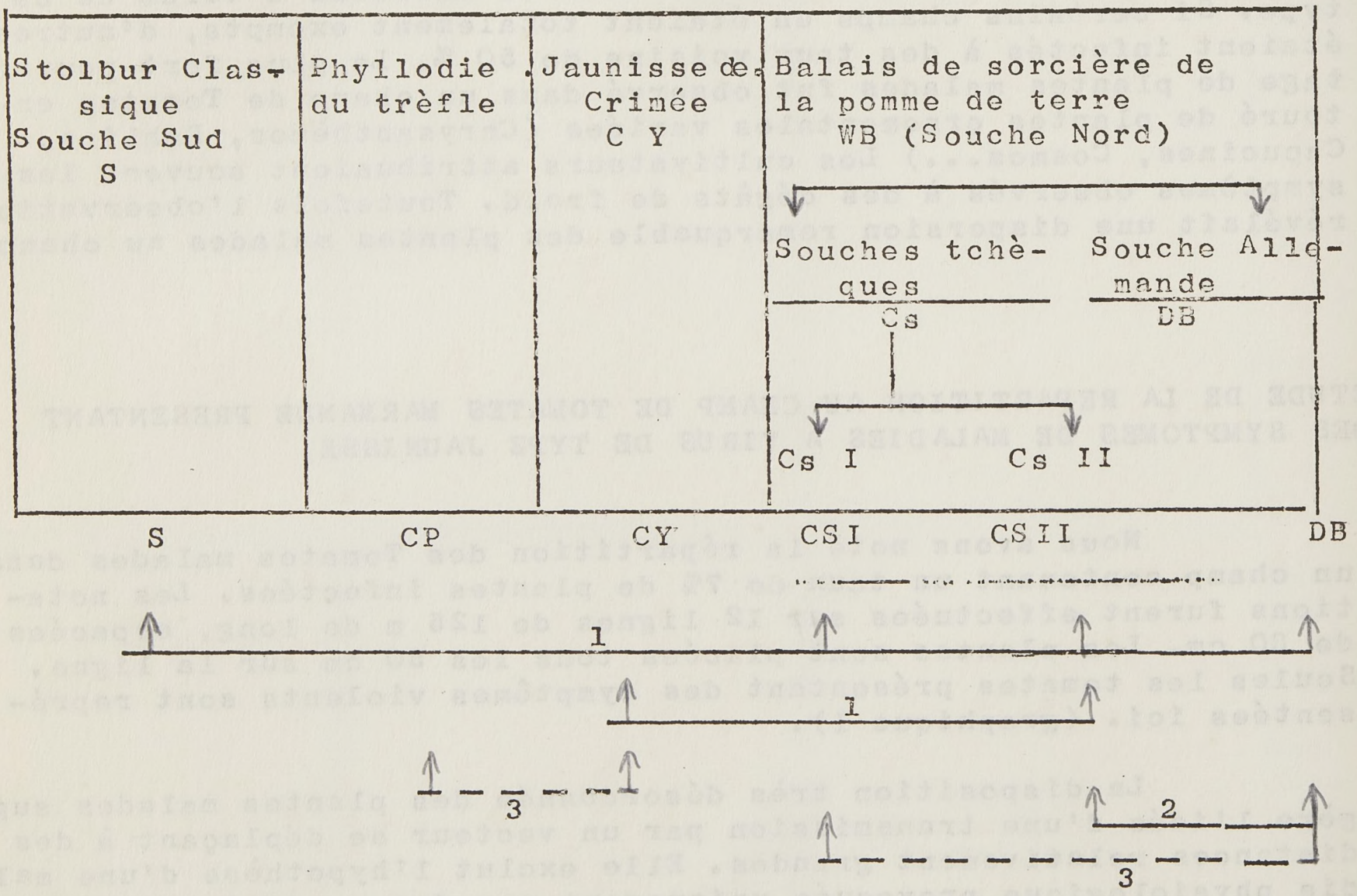
Malheureusement ce graphique, effectué tard en saison le 1/10/62 ne nous permet pas de suivre l'evolusion des symptômes

.../...

dans le temps à partir des premiers foyers. L'étude comparative de l'évolution de la maladie et des populations de cicadelles vectrices du Stolbur fournierait de précieux renseignements.

II - SYMPTOMATOLOGIE. SOUCHES DE "JAUNISSES"

Nous avons aussi remarqué une grande diversité des symptômes observés. Sous le nom de maladie à virus de type "Jaunisse Européenne" on désigne de nombreux virus ou souches de virus dont les liens de parenté sont encore mal définis. Il semble particulièrement difficile, voir même impossible d'utiliser ici les différentes propriétés, antigéniques en particulier, qui servent habituellement de critères dans l'étude des relations existant entre des virus plus stables. VALENTA, le premier, a réalisé des essais de prémunition par greffage. Il a étudié les 4 groupes de virus suivants.



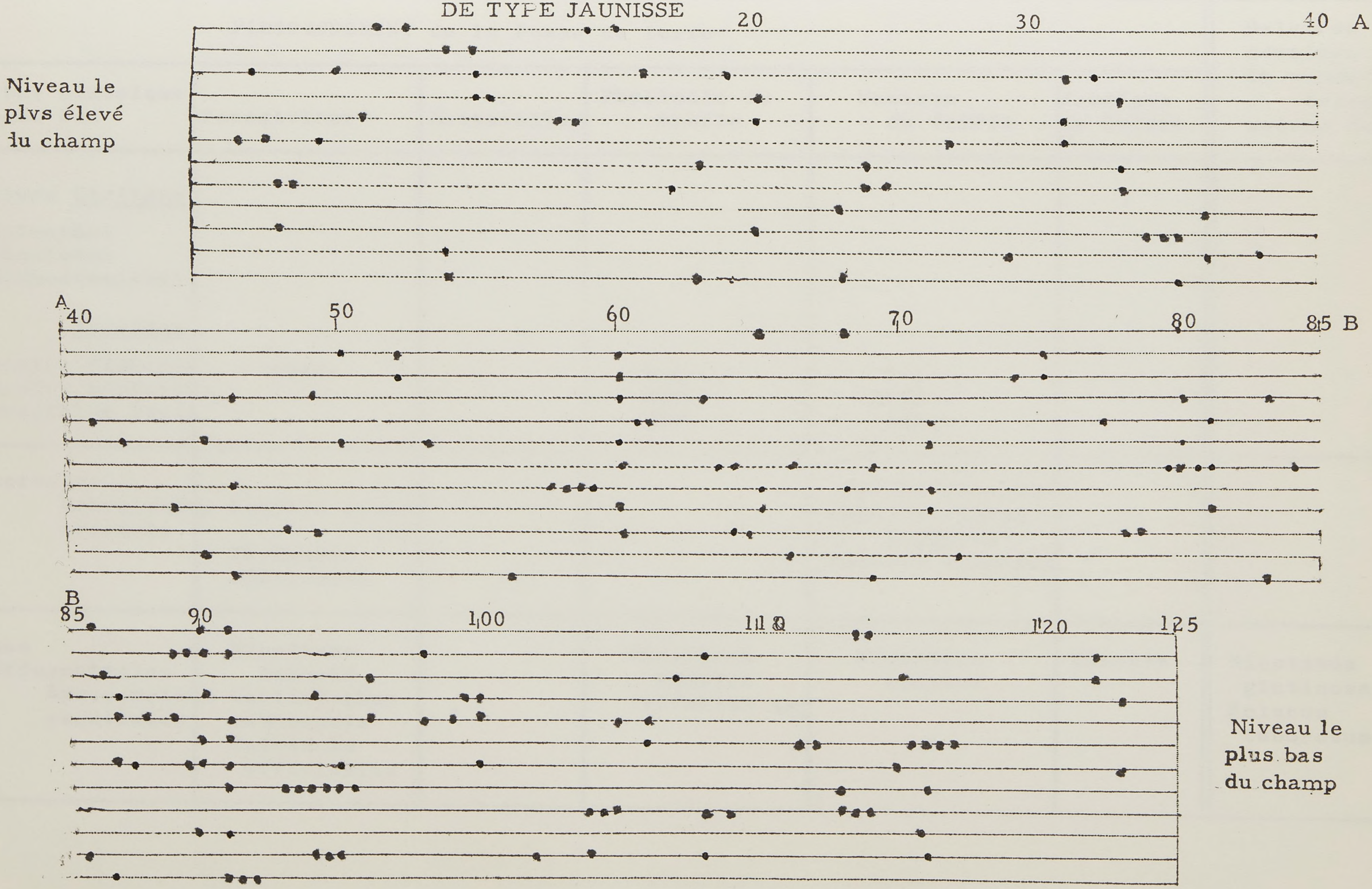
L'auteur n'a jamais obtenu la prémunition croisée qui seule révèle avec certitude un lien de parenté entre 2 souches

.../...

REPARTITION AU CHAMP DE TOMATES : MARMANDE

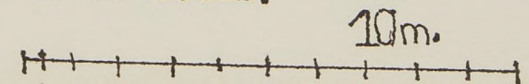
PRESANTANT DES SYMPTOMES VIOLENTS DE MALADIE A VIRUS

DE TYPE JAUNISSE



nb. Les tomates observées sont réparties sur 12 lignes de 125m. de long, espacées de 80cm.

Pour la commodité de la représentation les lignes sont coupées en A et B



MALADIES A VIRUS DE TYPE " JAUNISSE "

FLETRISSEMENT de la Pomme de terre						Balais de sorcière de la pomme de terre souche Nord
Stolbur classique souche Sud	Parastolbur	Metastolbur	Phyllodie du trèfle	Nanisme du Trèfle	Jaunisse de Crimée	
Vecteurs Cixiidae Eyalesthes obsoletus mlokosiewiezii Jassidae Euscelis Plebejus Aphrodes bicinctus Macrosteles levis	idem.		idem. idem. idem.	idem. idem. idem.		
Réservoirs : Convolvulus arvensis	Souchus arvensis Taraxacum officinale			Stellaria media Capsella bursa pastoris Senecio vulgaris		
hôtes differentiels: Lycopersicum esculentum	Nicotiana tabacum Callistephus chinensis Calendula officinalis		Nicotiana rustica Trifolium spp	Nicotiana rustica	Cuscute	Nicotiana glutinosa Solanum tuberosum

tableau n° 2

d'un même virus. Toutefois il a observé un comportement très différent des virus les uns par rapport aux autres qu'il semble intéressant de résumer ici.

1) Prémunition unilatérale

La Stolbur classique (Souche faible ou virulente) prémunit la plante contre les inoculations ultérieures par une souche quelconque du virus des balais de sorcière de la pomme de terre (Souches Tchèques ou Allemandes). Cette prémunition n'est jamais croisée. Une infection initiale par une souche du virus des balais de sorcière ne prémunit pas contre l'infection ultérieure par une souche de Stolbur classique. Dans tous les cas on observe finalement les symptômes du Stolbur classique. Les mêmes résultats ont été obtenus avec le virus de la Jaunisse de Crimée et une souche Tchèque : Cs II du virus des balais de sorcière.

2) Masquage momentané des symptômes

Valenta a observé un curieux phénomène de masquage des symptômes à la suite d'inoculations successives par greffage de 2 souches du virus balais de sorcière : la souche Tchèque Cs II et la souche Allemande DB. On assiste pendant 4 mois 1/2 à une disparition des symptômes. Il ne s'agit pas ici de prémunition vraie. Les 2 virus existent dans la plante comme en témoignent les observations suivantes. Après la période de masquage on assiste à une lente réapparition des symptômes. D'autre part, si l'on inocule des fragments de plantes, prélevés au cours de la période de masquage, à des plantes saines on assiste à une apparition des symptômes chez la plante saine. Dans ce cas toutefois la période d'incubation est accrue. Malheureusement les méthodes actuelles ne nous permettent pas de doser le virus dans la plante afin d'expliquer le phénomène. VALENTA conclut que dans ce cas il existerait une parenté réelle entre les souches.

3) Absence de parenté

La Phyllodie du trèfle et le virus de la Jaunisse de Crimée seraient 2 virus différents. Ces essais de prémunition ont été confirmés par l'étude de la sensibilité à la chaleur in vivo. Enfin on assiste même à la formation d'un complexe entre 2 souches du virus des balais de sorcière : la souche Tchèque Cs I et la souche Allemande DB.

Ce résumé des données acquises semble nécessaire pour comprendre la difficulté que présente l'identification des virus ou souches de virus rencontrés.

.../...

A quel groupe appartiennent les virus observés dans le bassin Parisien ? La seule observation des symptômes suggère la présence de plusieurs virus différents de type jaunisse.

- Le Stolbur classique Souche Sud. La symptomatologie et la transmission du virus par greffage semblent permettre à elles seules, l'identification. La Tomate prend un aspect gothique (3) très caractéristique, décrit par Blattny. La maladie est d'abord visible au sommet de la plante, les folioles sont très petits, séparés les uns des autres et contiennent des anthocyanes. L'axe floral est érigé, le calice hypertrophié.

- En ce qui concerne les autres souches de virus rencontrées (4-5) nous ne sommes pas actuellement en mesure de les préciser. Nous avons observé sur Marmande des symptômes très variés allant du type rosette peu accentué à un épaississement considérable des tiges et duspétioles. La présence du virus de la Mosaïque du Tabac en complexe rend l'identification encore plus difficile. Sur une Tomate, dont la variété nous est malheureusement inconnue, nous avons remarqué une prolifération très caractéristique. Des pousses latérales fortement renflées à la base apparaissent à différents niveaux de la plante et en particulier sur la nervure moyenne des feuilles. (fig.6)

III - ESSAIS DE TRANSMISSION A PLUSIEURS SOLANEES PAR GREFFAGE

Pour démontrer la nature virale de la maladie nous avons effectué des essais de transmission par greffage. Un lambeau de plante malade est introduit dans une fente correspondante du porte greffe sain. On assure ainsi le contact du cambiums. Ce mode de greffage "Chip Budding" nous a donné de meilleurs résultats que la greffe en fente terminale.

- Greffage sur Tomates Marmande et Red Jacket

Les premiers symptômes furent observés après une période d'incubation variant de 28 à 40 jours.

- Greffage sur Nicotiana Tabacum var. Samsum.

Très rapidement les Tabacs présentèrent une mosaïque intense due à la présence du virus de la Mosaïque du Tabac en complexe. L'inoculation de feuilles prélevées sur ces tabacs à N. Tabacum var.Xanthi provoquait l'apparition de nombreuses lésions locales.

Il convenait donc d'éliminer ce virus. Nous avons, dans ce but, effectué des greffes à des pommes de terre var. Bintje. Nous n'avons cependant pas réussi à cultiver une souche indemne du virus de la Mosaïque du Tabac à partir de la Pomme

.../...

3. MT. Cousins

4 MTC

5 MTC

de terre. Il semble donc préférable d'effectuer le passage réalisé par PECAUT et LATERROT, sur Nicotiana Tabacum var.Xanthi pour éliminer le virus de la Mosaïque du Tabac.

IV - ETUDE HISTOLOGIQUE

Nous avons effectué des coupes dans des tiges saines et fortement épaissies de Tomates Marmande provenant du champ représenté sur le graphique I. Les coupes ont été colorées au carmin aluné et vert d'iode après fixation à l'alcool puis conservées dans du baume selon la méthode classique.

De la périphérie vers la moelle on observe chez les plantes infectées les modifications suivantes :(fig. 7-8-9).

- La disposition en festons de l'endoderme et du péricycle par suite du départ accru de bourgeons axillaires.
- L'hyperplasie du liber externe où l'on observe par endroit des îlots de cellules à gros noyaux parmi les tubes criblés.
- Le contour irrégulier du cambium libéro-ligneux.
- Les lacunes dans le bois secondaires dues à l'accroissement intense du liber interne.
- Enfin on observe en particulier le développement d'un tissu caractéristique de l'infection à partir du liber interne. Chez certaines familles botaniques (Solanées en particulier) il existe un liber interne surtout constitué de tubes criblés et toujours séparé du bois primaire par plusieurs assises de parenchyme médullaire. Ce tissu est profondément modifié chez les plantes infectées. Quelques tubes criblés conservent leur emplacement initial à l'intérieur de la moelle. Ils sont cependant moins nombreux et disposés plus irrégulièrement que dans les tiges saines. La plupart des cellules du liber interne se trouvent groupées en un tissu caractéristique de la maladie situé au contact du bois. Ce tissu, fortement hyperphasié est constitué de tubes criblés et de cellules à noyaux prohéminents comparables aux cellules compagnes. Ces cellules sont serrées et écrasées les unes contre les autres. Ce tissu se trouve réparti en îlôts bien délimités dans la moelle ou forme une bande continue à l'intérieur du bois.

Cette étude montre les analogies existant entre les modifications anatomiques observées ici et celles qui ont été décrites par SAMUEL (G) BALD (J.C) et EARDLEY (C.M) au sujet du Big Bud de la Tomate en Australie et par RASA (A) et ESAU (K) concernant le Curly top et l'Aster yellow de la Tomate en Amérique. Nous sommes en présence de virus très particuliers affectant essentiellement le liber. Il conviendrait d'étudier les modifications anatomiques provoquées par les diverses souches de virus de type jaunisse rencontrées sur les différents organes d'une même plante.

.../...

V - DISCUSSION

Si les maladies à virus de type jaunisse se propagent en Franc elles poseront de graves problèmes pour la culture de la Tomate. Les mo- saïques, affectent peu la qualité des fruits. Elles influent surtout sur le rendement par une réduction du nombre et de la taille des fruits. Les maladies à virus de type jaunisse interviennent à la fois sur le rendement et la qualité des fruits. Souvent les fruits avortent, ou restent petits, durs, amers, se colorent lentement ou pas du tout. Les tissus placentaires continuent à s'accroître et l'on observe fréquemment un éclatement des tissus et une libération d'ovules avortés : le fruit présente alors des symptômes de "Cat face".

Il convient donc d'envisager des méthodes de lutte efficace. La recherche de la résistance peut être envisagée sous différents points de vue : Résistance variétale tout d'abord : Les essais de greffage réalisés à la Station de Montfavet sur différents lycopersium semblent peu prometteurs. Ce mode expérimental de transmission ne donne pas cependant une image exacte de la sensibilité des plantes dans la nature où il convient d'envisager non seulement la sensibilité de la plante à l'infection mais aussi à l'inoculation par cicadelles vectrices. Celles-ci se comportent différemment vis à vis des diverses variétés de Tomates : Les Tomates en buisson seraient plus sensibles. Les cicadelles atteignent plus facilement le liber.

VI - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BLATTNY(C.) BREAK (J.) POZDENA (J.) DLABOLA (J.)LIMBERK (J.) et BOJNANSK (V). Die übertragung des stolburvirus bei tabak und tomaten und seine virogeographischen bezi hungen. Phytopath. Z. 22,4-381, 416-4

BOVEY (R.) - Une nouvelle maladie à virus de la Tomate en Suisse romande Ann.Agric.Suisse. T,57,599-611, 1956

RASA (A.) et ESAU (K). - Anatomic effects of Curly top and Aster Yellow on tomato.Hilgardia 30, 17 pp 469-5I5, 1961

SAMUEL (G.) BALD (J.G.) EARDLEY (C.M.) BIG BUD, a virus disease of Tomato. Phytopath. 23, 64I-653, 1933.

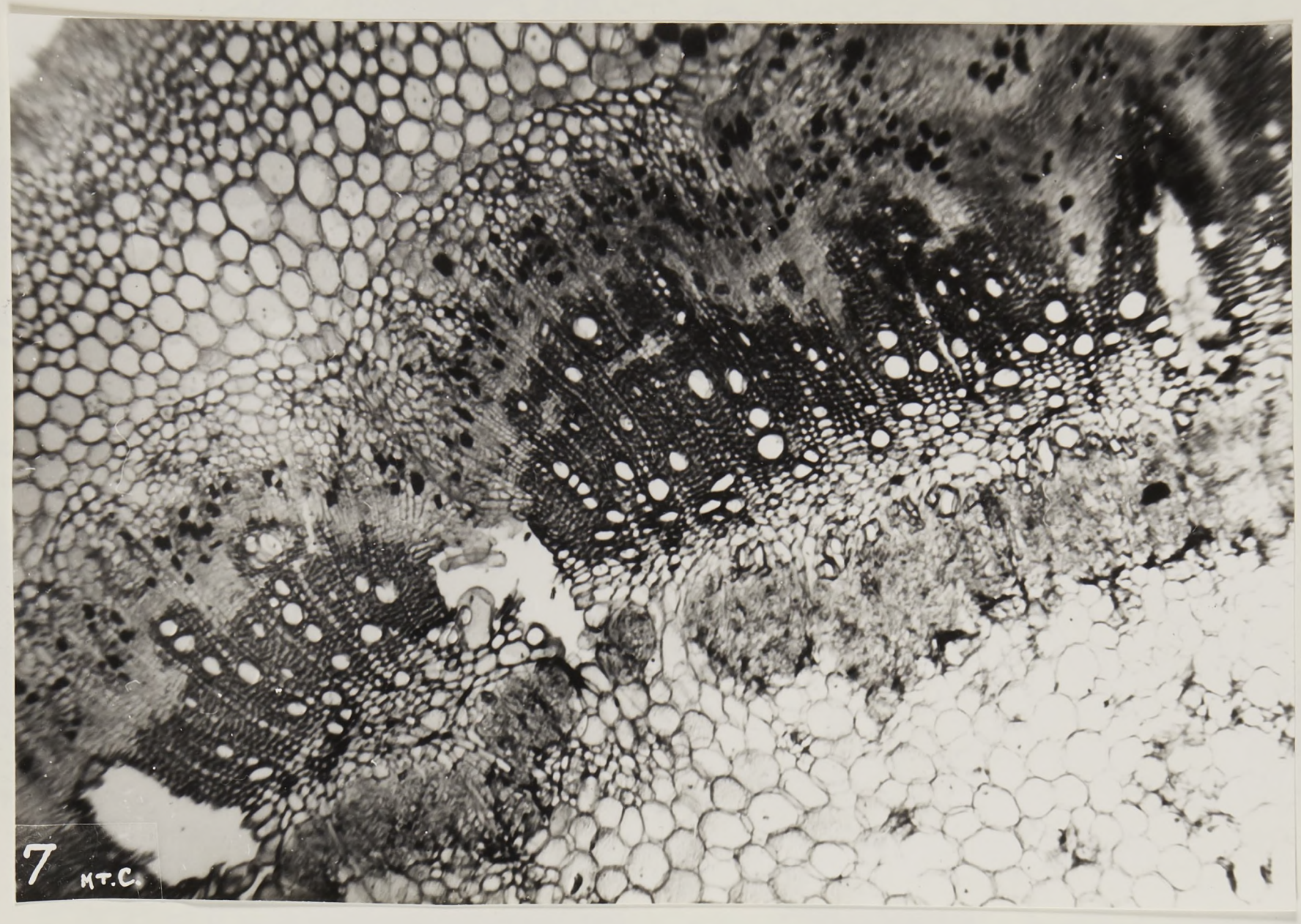
VALENTA (V.) Interference studies with yellow type plant viruses I cross protection tests with European viruses.-Acta virol, 3, 2 pp 65-72, 1959.

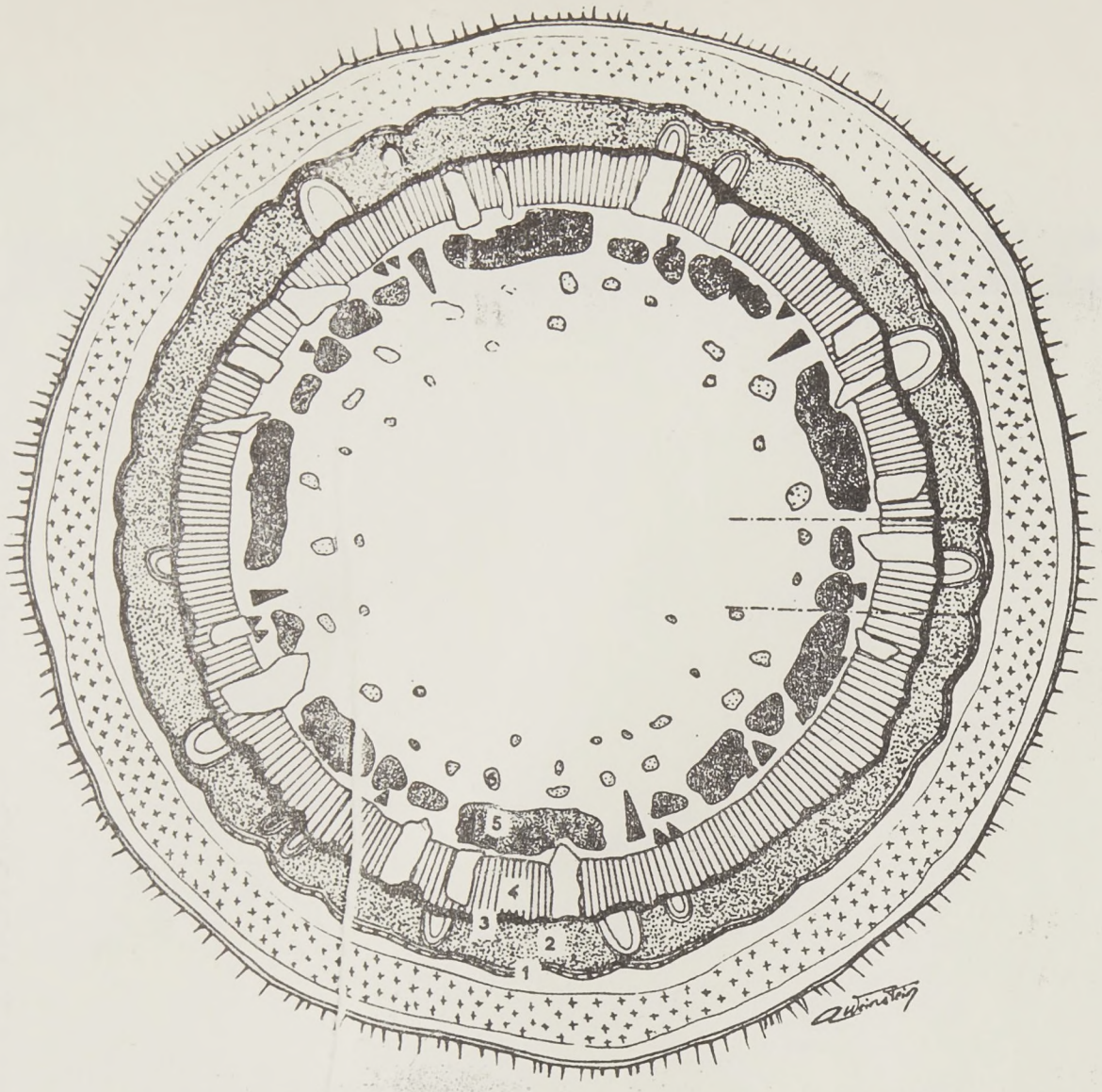
VALENTA (V.) Investigations on Stolbur and related viruses pp I4I-I45. Proceedings of the fourth conférence on potato virus diseases Braunschweig 12, 17 sept. 1960.

VALENTA (V.) MUSIL (M.) MISIGA (S.) - Investigations on European yellows type viruses. The Stolbur virus. - Phytopath.Z 42, 1 pp 1-38, 196I

VII - Remerciements

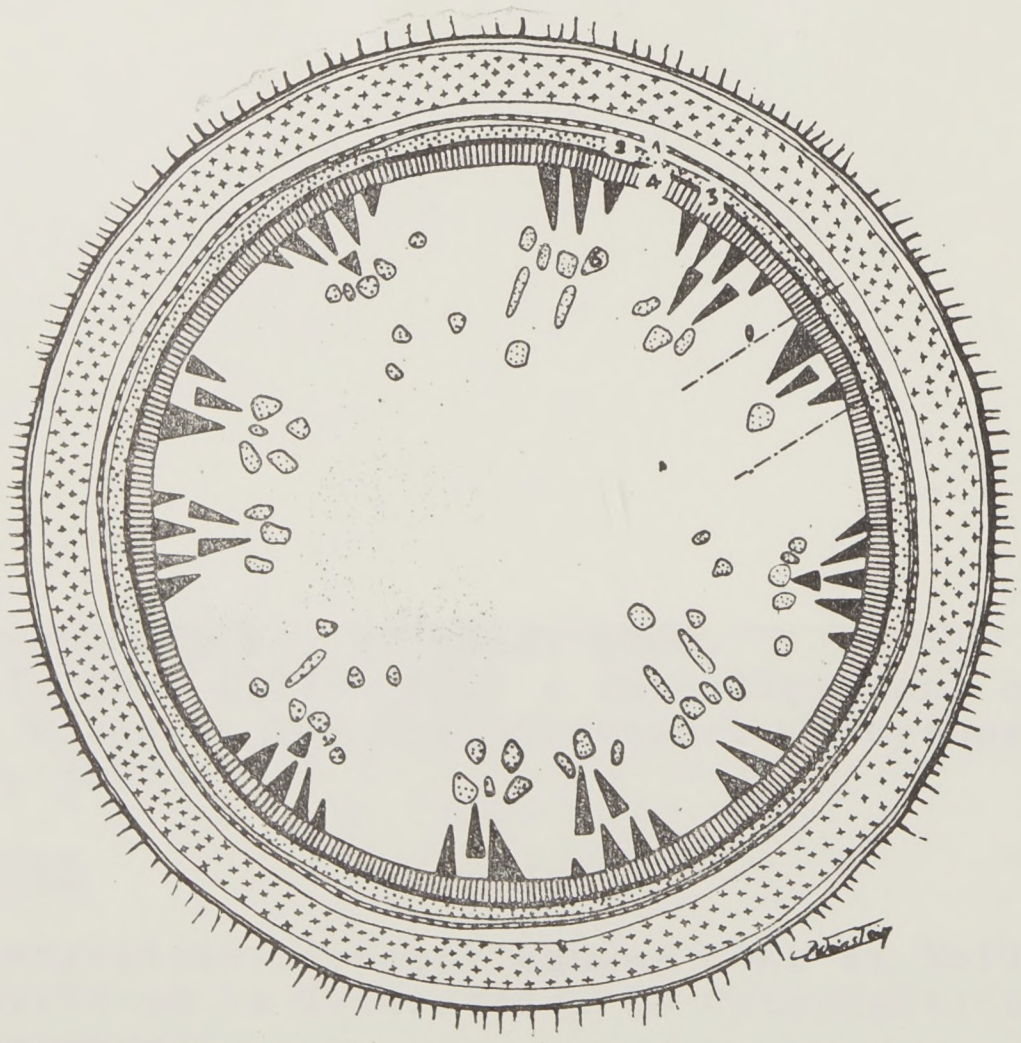
Nous remercions vivement Madame HUAU et Melle WEINSTEIN pour les dessins au trait et le laboratoire de Cytogénétique pour le tirage de photos au microscope.


7
MT.C.



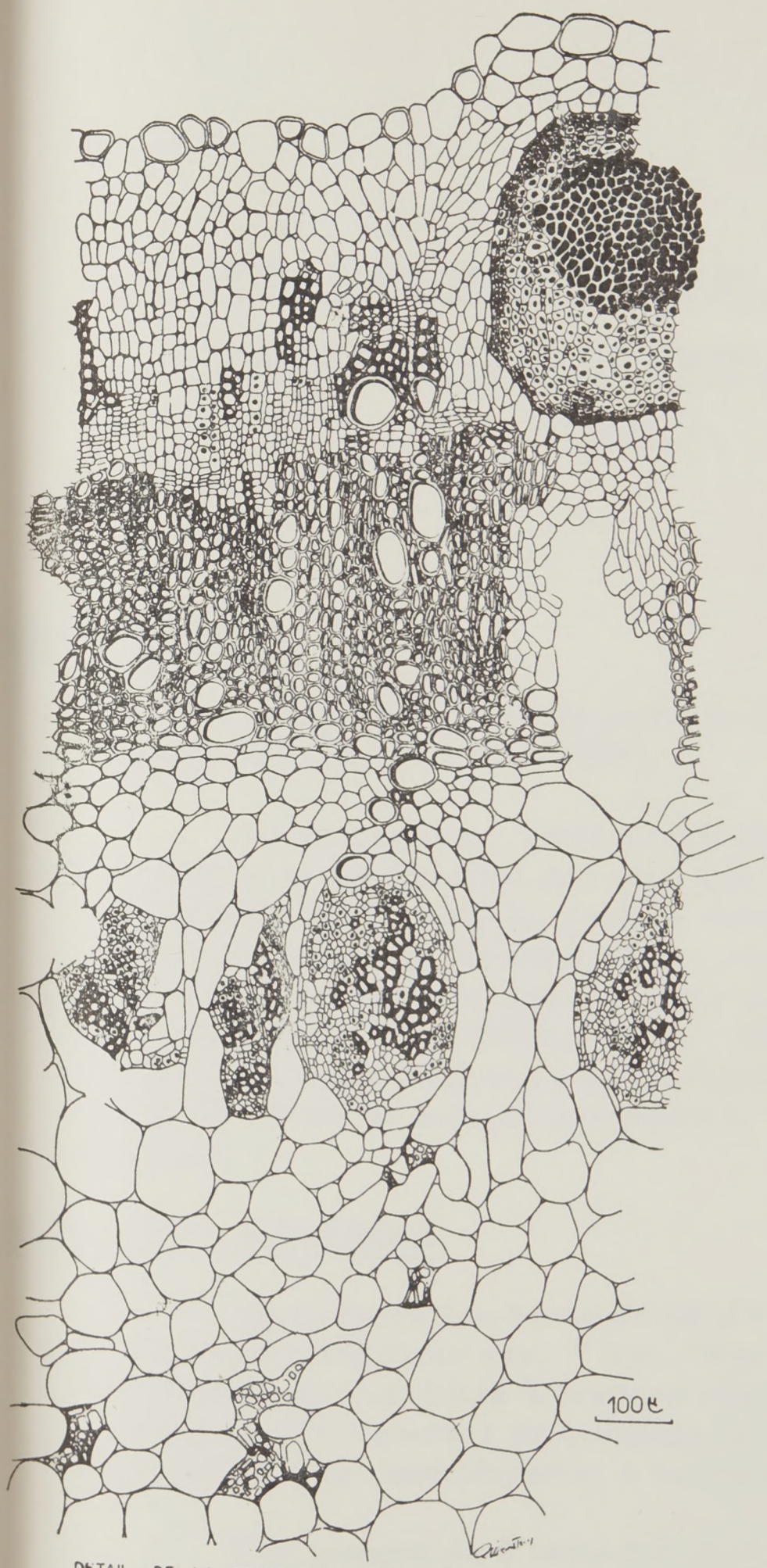
.A. Coupe transversale d'une tige de tomate infectée à maturité.

1 Endoderme et péricycle festonnés par suite du départ accru de bourgeons axillaires.
2 Liber externe hyperplasié.
3 Cambium sinueux.
4 Bois secondaire présentant des lacunes.
5 Liber interne caractéristique de l'infection, constitué de petites cellules serrées.
6 Liber interne normal.



8 .B. Coupe transversale d'une tige de tomate saine au même stade

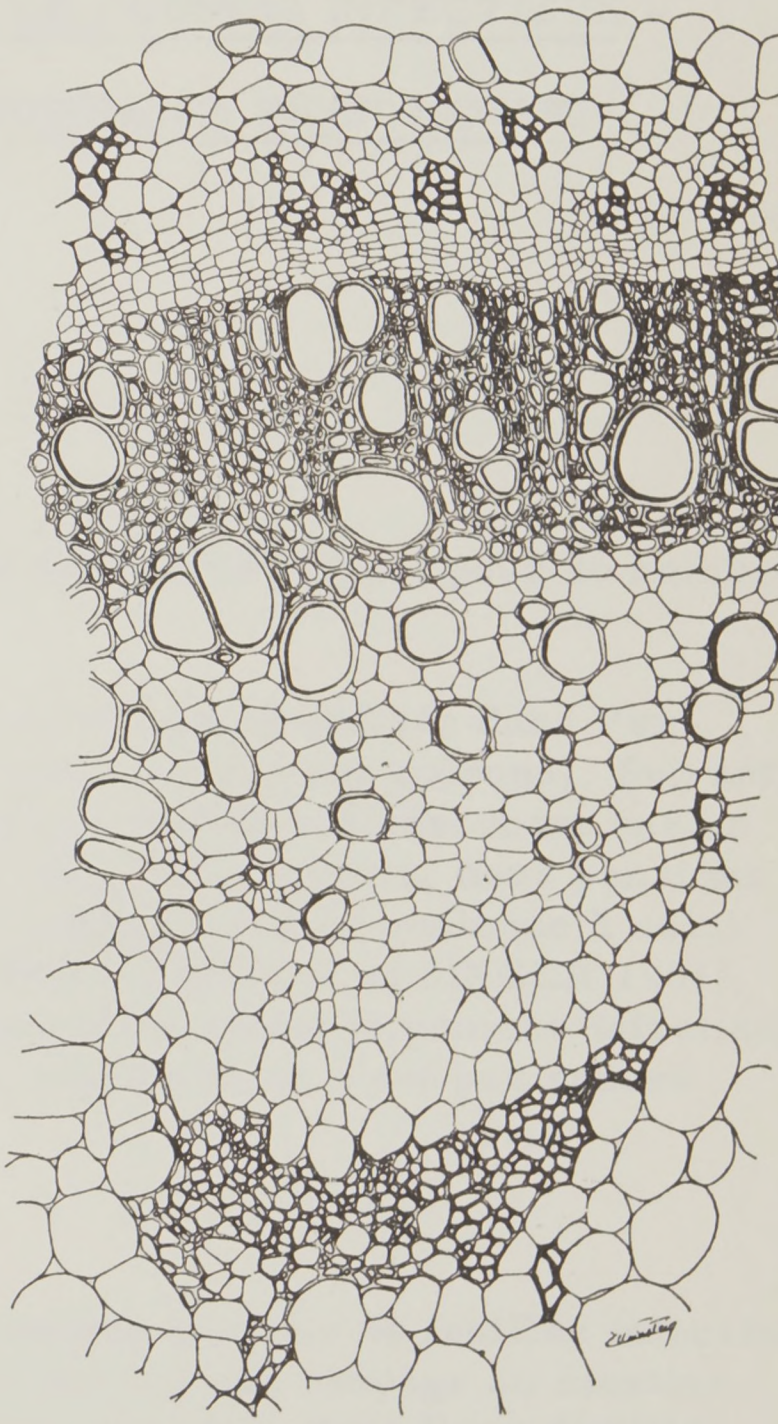
1 Endoderme et péricycle régulièrement circulaires.
2 Liber externe.
3 Cambium circulaire.
4 Bois secondaire continu.
6 Liber interne normal situé à l'extrémité du bois primaire.



- DETAIL DE LA COUPE A, du péricycle à la moelle

Tube criblé.

Petite cellule à noyau prédominant comparable à une cellule compagne.



- DETAIL DE LA COUPE B, du péricycle à la moelle

Tube criblé.

- EFFET DE L'ALUMINE HYDRATEE SUR LE POUVOIR INFECTIEUX - D'UNE PREPARATION DE VIRUS du "SOUTHERN BEAN MOSAIC".

B. DIGAT.

-:-

INTRODUCTION.

L'Alumine hydratée possède un fort pouvoir adsorbant pour de nombreux colloïdes (WILLSTATTER 1920).

En particulier, cette propriété est couramment utilisée dans l'extraction et la purification des enzymes (chromatographie sur colonne). Suivant les conseils de D. SPIRE, nous avons examiné l'effet de cet adsorbant sur un jus brut de virus du "Southern Bean Mosaïc" (SBMV). A priori, nous pensions que l'Alumine hydratée pouvait jouer un rôle antinucléasique analogue à celui de la Bentonite (BROWNHILL 1959 - FRAENKEL- CONRAT et SINGER 1961). Il s'est avéré que l'Alumine hydratée augmentait fortement le pouvoir infectieux de SBMV. Mais le mécanisme exact de cette augmentation n'est pas encore expliqué.

METHODE ET MATERIEL.

La préparation brute de SBMV est obtenue à partir de feuilles infectées de Phaseolus Vulgaris var. " Top Crop ". On extrait par broyage au mortier le jus brut que l'on filtre à travers une étamine. On dilue dans l'eau distillée en ajoutant 2 à 3 gouttes de bisulfite de sodium technique ; on clarifie le jus ainsi obtenu par centrifugation à faible vitesse.

Une gamme de 9 tampons phosphates SOERENSEN comprenant les trois concentrations : 0,05 M, 0,1 M et 0,2 M. aux p h 6, pH 7 et P H 8, est réalisée.

On ajoute 0,5 g d'Alumine hydratée pure à 2 cc de chaque tampon, puis 2 cc de la préparation de SBMV sont dilués dans chaque échantillon que l'on centrifuge 10 minutes à 5000 t/m.

.../...

dans le surnageant recueilli (2cc environ), on ajoute encore 0,25 g d'Alumine hydratée. Après une nouvelle centrifugation (10 minutes à 5.000 t/M.) on recueille finalement le surnageant qui servira d'inoculum.

Les solutions témoins subissent exactement les mêmes opérations sans adjonction d'Alumine hydratée.

EXPERIMENTATION.

L'essai est réalisé en serre à la température de 20° environ sur Phaseolus vulgaris var. "Pinto" âgé de 15 jours.

Les inoculations mécaniques sont faites sur une des feuilles cotylédonaires (Carborundum en pré-inoculation. Lavage des feuilles dans les 2 minutes qui suivent l'inoculation). 36 plants sont inoculés.

L'apparition des premières lésions a lieu 5, 6 jours après l'inoculation

RESULTATS

Symboles :

C : Concentration moléculaire du tampon.
S : Solution centrifugée en présence d'Alumine hydratée
T : Solution Témoin.
PR: Pouvoir infectieux relatif de la solution centrifugée S par rapport à la solution Témoin T.

Nombre moyen de lésions locales par feuille.

C	pH 8			pH 7			pH 6		
	S	T	P.R.	S	T	P.R.	S	T	P.R.
0,[illegible]M	11	12	1	33	2	16,5	24	8	3
0,[illegible]	18	1	18	35	2	17,5	15	8	1,9
0,2 M	9	1	9	7	2	3,5	24	14	1,8

L'effet de l'Alumine hydratée est maximum en présence de tampon à pH 7 et à concentrations molaires 0,1M.

..././//

DISCUSSION

L'alumine hydratée augmente le pouvoir infectieux de SBMV dans des proportions notables (jusqu'à 18 fois par rapport au témoin).

Lors des opérations de centrifugation, l'effet de l'Alumine hydratée sur le pouvoir infectieux de SBMV pourrait être :

- soit direct : il n'est pas exclu que l'Alumine hydratée ait quelque effet sur les particules virales elles-mêmes.
- soit indirect : il est possible que certains inhibiteurs de SBMV soient entraînés par adsorption.

BIBLIOGRAPHIE

ATABEKOV (I.G.) . - Ion exchange adsorption of plant Viruses.
Voprossi Virusol - 1961, 6 : 669-672.

ATABEKOV(I.G.) - NOVIKOV (V.K.) - Adsorption of phytopatogenic Viruses on to"molecular" sorbents.
Voprossi virusol - 1961, 6 : 673-678.

ATABEKOV (I.G.) - Utilization of Soviet ionites for purification of plant Viruses.
Voprossi Virusol, 1960, 5 - 496-500.

FRAENKEL-CONRAT. - SINGER TSUGITA. - Purification of viral RNA by means of Bentonite.
Effects of Bentonite on infectivity and stability of TMV-RNA.
Virology 14, 14, 1961, 54-65.

FRISCH-NIGGEMEYER et REDDI. - Studies on Rnase in tobacco leaves I Purification and Properties.
Biochem. et Biophys, Acta - 1957, 26 : 40-46.

TAKAHASHI. - The effect of pH on the linear aggregation of TMV.
Am. J. Bot. 1949, 36 - 642.

VALENTINE. - ALLISON. Virus particle adsorption.
Biochem et Biophys. ACTA. 1959. 34 : 10.

YARWOOD (C.E.) - The phosphate effect in plant virus inoculations - Phytopathology : 42, 1952.

WILLSTATTER. - The adsorption of Enzymes.
Colloïd Chemistry ,1928 - Tome II., 361-363.

LA NATURE DE L'INFORMATION GENETIQUE POUR LA SYNTHESE DES PROTEINES

P. BOISTARD

I - INTRODUCTION

Depuis la découverte fondamentale, par BEADLE et TATUM. (BEADLE G.W. et TATUM E.L. 1941) du contrôle génétique des étapes de biosynthèse des métabolites essentiels chez Neurospora crassa, des progrès considérables ont été accomplis dans l'étude de ces mécanismes.

Les expériences de HERSHEY et CHASE (1952) sur le bactériophage T_2 ont permis d'assigner à l'acide désoxyribonucléique du virus le rôle essentiel dans l'initiation et le contrôle des processus conduisant à la production et à la libération de nouvelles particules virales. Le phage est en effet constitué d'une tête de nature nucléique entourée d'une enveloppe protéique. Si l'on marque sélectivement le constituant nucléique par du phosphore radioactif alors que la protéine est marquée, elle, par du soufre radioactif, au cours de l'infection seul le phosphore radioactif pénètre à l'intérieur de la bactérie. La radioactivité du phosphore se retrouve intégralement dans l'A.D.N. des nouvelles particules virales issues du cycle viral.

Le phénomène de transformation chez les bactéries a permis lui aussi de mettre en évidence le rôle biologique de l'A.D.N. Une préparation d'A.D.N. d'un pneumocoque encapsulé, confère à la bactérie réceptrice le phénotype de la bactérie donneuse. (AVERY et COLL 1944). La bactérie ainsi transformée conserve son nouveau phenotype à travers des générations successives et le nouveau clône bactérien peut fournir par extraction une préparation d'A.D.N. transformant. Donc non seulement l'A.D.N. contrôle la production de la capsule, mais encore il est capable de se multiplier comme tout élément du patrimoine génétique.

Le modèle de Watson et Crick issu de l'étude de données physiques et chimiques permet de rendre compte d'un grand nombre de propriétés biologiques de l'A.D.N. support de l'information génétique. (WATSON V.S. et CRICK F.H.C. 1953). En particulier, la constitution de l'A.D.N. en double hélice, les 2 bases d'une paire étant liées par des liaisons hydrogènes spécifiques de chaque base, explique à la fois la stabilité de l'information génétique et la possibilité de mutations.

.../...

Si l'A.D.N. est donc le support de l'information génétique, c'est par l'intermédiaire des protéines que l'A.D.N. confère les caractères génétiques à un organisme. En effet des enzymes catalysent chacune des étapes de la biosynthèse des métabolites essentiels chez N. crassa et l'absence ou le caractère non fonctionnel d'une de ces enzymes confère le phénotype mutant biochimique pour le métabolite envisagé (MITCHELL H.K. et LEIN J. 1948).

La structure primaire des protéines, élucidée complètement pour la première fois par SANGER sur l'in suline consiste en une séquence linéaire d'acides aminés unis les uns aux autres par des liaisons peptidiques. Dans certains cas, on a pu mettre en relation un caractère mutant et une modification qualitative d'une protéine enzyme. La technique d'INGRAM (INGRAM V. 1958) a permis d'identifier la modification qualitative avec le remplacement d'un acide aminé. Après hydrolyse par la trypsine ou la chymotrypsine qui coupent les protéines de façon reproductible et spécifique, on effectue une chromatographie puis une électrophorèse des peptides produits suivant deux dimensions perpendiculaires. Chaque peptide prend une place caractèristique de sa charge et de sa taille. Le remplacement d'un acide aminé acide par un acide aminé neutre dans un peptide modifie la place de ce peptide et donc "l'empreinte digitale " de la protéine. YANOFSKY a ainsi décelé des remplacements d'acides aminés dans la tryptophane synthétase d'E.coli. (YANOFSKY et coll.1961) Lorsque deux mutants distincts ont chacun une empreinte digitale différente de celle de la protéine normale, le recombiné double mutant montre dans son "empreinte digitale" une double altération. Une mutation localisable sur la carte génétique d'E.coli se traduit par le remplacement d'un acide aminé localisable dans une séquence d'acides aminés.

Le contrôle génétique semble donc s'exercer sur la séquence des acides aminés formant la structure primaire des protéines. Le seul élément variable de l'A.D.N. étant l'ordre des 4 bases puriques et pyrimidiques, on a émis l'hypothèse suivant laquelle la structure primaire des protéines est déterminée par la séquence des bases puriques et pyrimidiques de l'A.D.N. Le code génétique permet la transmission à la structure primaire des protéines de l'information contenue dans la séquence des bases de l'A.D.N.

D'une part il y a 4 bases, d'autre part 20 acides aminés. Quelle est donc la correspondance entre la structure linéaire des acides nucléiques et la structure primaire des protéines.

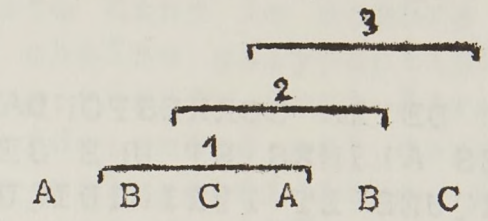
Les problèmes qui se posent sur la transmission de l'information génétique sont donc les suivants :

1) Quel est le nombre de bases qui constitue le signal pour un acide aminé ?
2) Le code est-il dégénéré dans les deux sens ou non dégénéré ou

.../...

dégénéré dans un seul sens ? Autrement dit un même signal peut-il correspondre à plusieurs acides aminés ? plusieurs séquences de bases peuvent-elles avoir la même signification ? Ou au contraire, à chaque acide aminé correspond-il un signal particulier et un seul ?

3)Le code est-il chevauchant ? Autrement dit une base de la séquence A.D.N. peut-elle appartenir à plusieurs signaux consécutifs ?



exemple de code chevauchant. La lettre A appartient aux "triplets" 1 2 et 3 : B C A C A B et A B C .

4) Si le code n'est pas chevauchant, quel est le système permettant la lecture du signal correct par exemple ABC et non BCA ou CAB ?

..... A B C A B C A ...

5) Le code est-il universel ? Autrement dit, un signal correspond-il à un même acide aminé dans n'importe quel organisme réalisant la synthèse des protéines ?

6) Quel est le signal pour chacun des 20 acides aminés.

7) La structure de l'A.D.N. étant une double chaîne, chacune des deux séquence porte t-elle l'information pour la synthèse des protéines ou au contraire l'information est-elle contenue dans la séquence d'une seule chaîne ?

8) Quel est le mécanisme de lecture du code ?

Nous ne suivrons pas dans cet exposé un ordre logique mais nous aborderons successivement les différentes voies expérimentales qui permettent l'étude du problème du code.

L'hypothèse de travail étant la correspondance entre la structure primaire des protéines et la séquence des nucléotides de de l'acide nucléique porteur de l'information ; La première voie d'approche, la plus logique, consisterait à déterminer la structure primaire d'une protéine et déterminer la séquence des nucléotides contrôlant le synthèse de cette protéine. Nous verrons quelles difficultés rencontre cette méthode qui n'a donné jusqu'à présent que des résultats partiels. Si donc on renonce à connaître directement la correspondance entre une séquence de bases et la structure primaire d'une protéine, deux propriétés du matériel génétique permettent néanmoins une étude indirecte de ce problème.

a) Par des agents mutagènes spécifiques on peut provoquer un remplacement en un sens connu de paires de bases par d'autres paires de bases. Par exemple l'acide nitreux désamine la cytosine en uracile et l'adénine en hypoxanthine qui a les mêmes propriétés électroniques que la guanine. D'autres substances mutagènes agissent en ajoutant ou en retranchant une base dans une séquence d'ADN.

b) La recombinaison génétique permet d'étude des effets cumulés de plusieurs mutations. Cette étude a abouti à de précieux

.../...

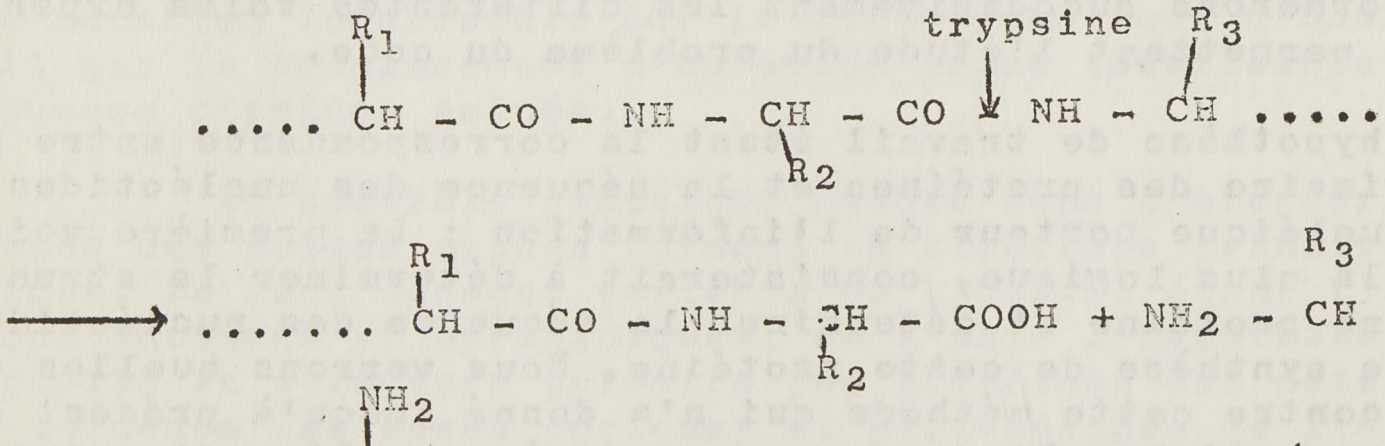
résultats lorsque ces mutations affectaient un segment du matériel génétique contrôlant la synthèse d'une même protéine.

La dernière méthode consiste à réaliser la biosynthèse des protéines en présence de signaux connus.

II - ETUDE ANALYTIQUE DE LA CORRESPONDANCE ENTRE UNE SEQUENCE D'ACIDES AMINES ET UNE SEQUENCE DE BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES

L'analyse de la structure primaire des protéines a pu être menée à bien pour quelques protéines - 2 raisons expliquent cette réussite :

1) La molécule protéique existe. Il est possible de séparer grâce à leurs propriétés physiques, chimiques, biologiques, les différentes espèces moléculaires protéiques présentes à l'intérieur d'une cellule. Au contraire, une préparation d'ADN bactérien montre une grande hetérogénéité dans ces propriétés biologiques testées par son pouvoir transformant. Seul l'acide nucléique isolé de certains virus semble ne constituer qu'une seule molécule.
2) Il existe des enzymes protéolytiques spécifiques coupant la séquence des acides aminés en des points bien déterminés de la chaîne polypeptidique. La trypsine par exemple hydrolyse la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique des acides aminés basiques.



Les peptides obtenus après l'action de ces enzymes se répartissent en espèces moléculaires bien distinctes. Ils peuvent être séparés les uns des autres. L'analyse de ces fragments est possible. La comparaison des peptides obtenus par deux enzymes différentes, la trypsine et la chymotrypsine le plus souvent, permet la reconstitution de la séquence complète de la chaîne. Pour les acides nucléiques, on ne connait pas d'enzymes semblables Les procédés de fractionnement des polynucléotides ne donnent donc pas de sous unités reproductibles de longueur suffisante.

.../...

Un handicap supplémentaire pour l'analyse des acides nucléiques consiste dans le nombre d'éléments variables de chaque chaîne. Soit une chaîne polypeptidique possédant 100 résidus acides aminés; chaque résidu peut-être choisi parmi 20 acides aminés différents. Un acide aminé est donc représenté en moyenne 5 fois dans cette chaîne polypeptidique. Si la précision dans l'analyse des acides aminés est de 10%, le nombre de résidus d'un acide aminé donné sera connu avec une erreur de 0,5 résidus. Le nombre d'éléments variables d'une chaîne polynucléotidique n'étant que de 4, une base "moyenne" sera représentée 25 fois dans une séquence de 100 nucléotides. La même précision de 10% dans l'analyse des bases se traduira par une erreur de 2,5 résidus. De plus, seules les chaînes nucléotidiques les plus courtes, celles de l'ARN de transfert par exemple, sont de longueur comparable à celles de protéines actuellement analysées.

Malgré ces difficultés, on possède deux catégories de données analytiques sur la séquence des bases dans les acides nucléiques, la proportion relative des 4 bases et le nombre de paires, par exemple AT AG AC AA etc...

Le contenu de l'ADN en guanine étant égal au contenu en cytosine en donne la proportion de base G + C dans la composition globale en bases de l'ADN. La proportion de G + C varie dans de très larges limites, de 25 à 72% suivant les organismes (SUEOKA 1961). Il y a là une contradiction apparente avec la constance de la composition en acides aminés des différentes protéines.

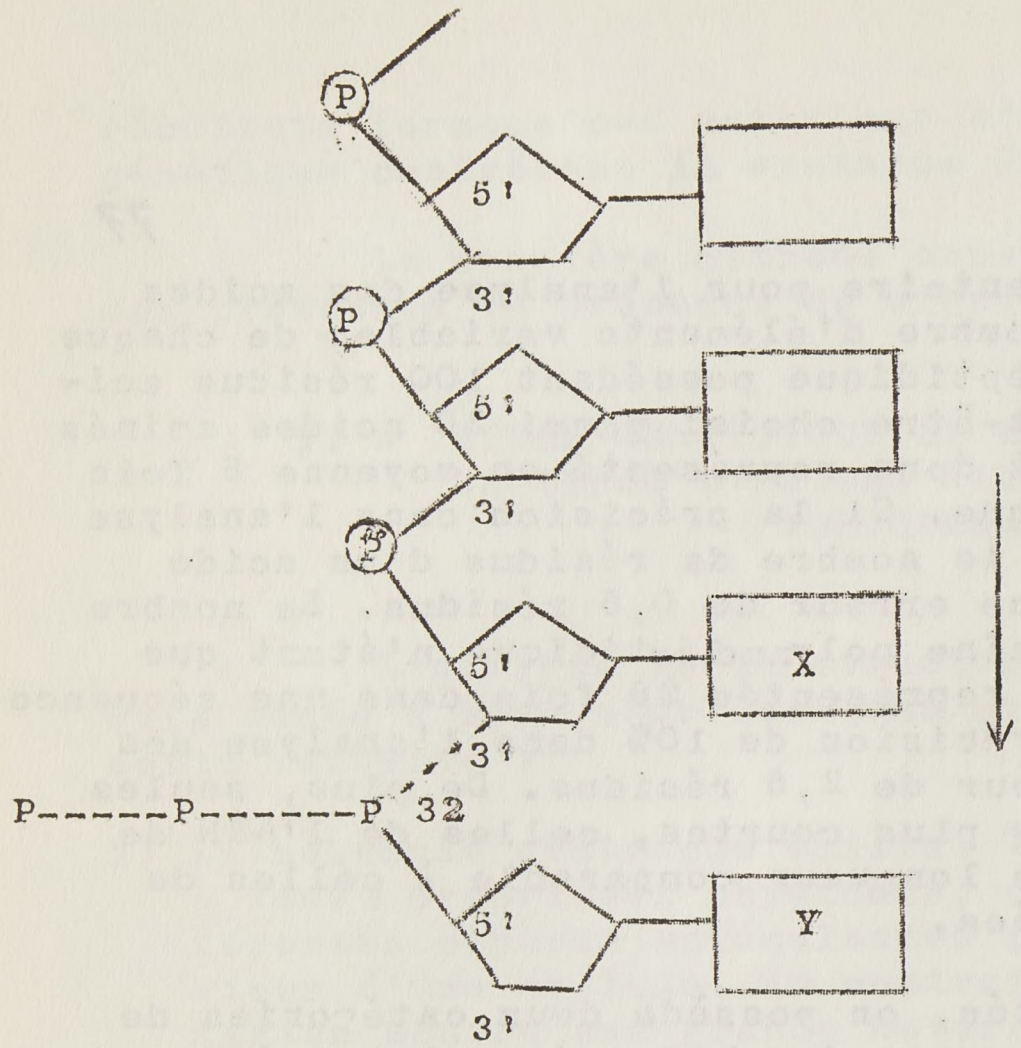
L'étude de la proportion des différentes paires a été faite par KORNBERG et COLL (JOSSE J., KAISER A.D., KORNBERG A. 1961) La DNA polymérase isolée et purifiée par KORNBERG réalise la synthèse de l'ADN à partir des 4 nucléosides trip hosp hates, en présence d'un modèle d'ADN. L'ADN synthétisé est une copie du modèle ADN.

Le milieu d'incubation est constitué d'un des 4 mélanges suivants :

$dATP^{32} + dGTP + dCTP + dTTP$
$dATP + dGTP^{32} + dCTP + dTTP$
$dATP + dGTP + dCTP^{32} + dTTP$
$dATP + dGTP + dCTP + dTTP^{32}$

Comme le montre la figure 1, le P^{32} qui est attaché au carbone 5' du désoxyribonucléoside Y est estérifié par le carbone 3' du désonyribonucléoside X, à l'extrémité par laquelle la chaîne d'ADN s'accroît.

.../...



sens d'accroissement
de la chaîne

Fig. I

Croissance d'une chaîne d'ADN
en présence d'ADN polymérase

Fig. 1

L'ADN est ensuite dégradé par l'ADNase de micrococcus et la phosphodiestérase de la rate de veau (Fig.2). Ces enzymes scindent la chaîne polynucléotidique entre le phosphore et le carbone 5' du disoxyribose ; le produit de cette dégradation est donc un ensemble de 3' mononucléotides.

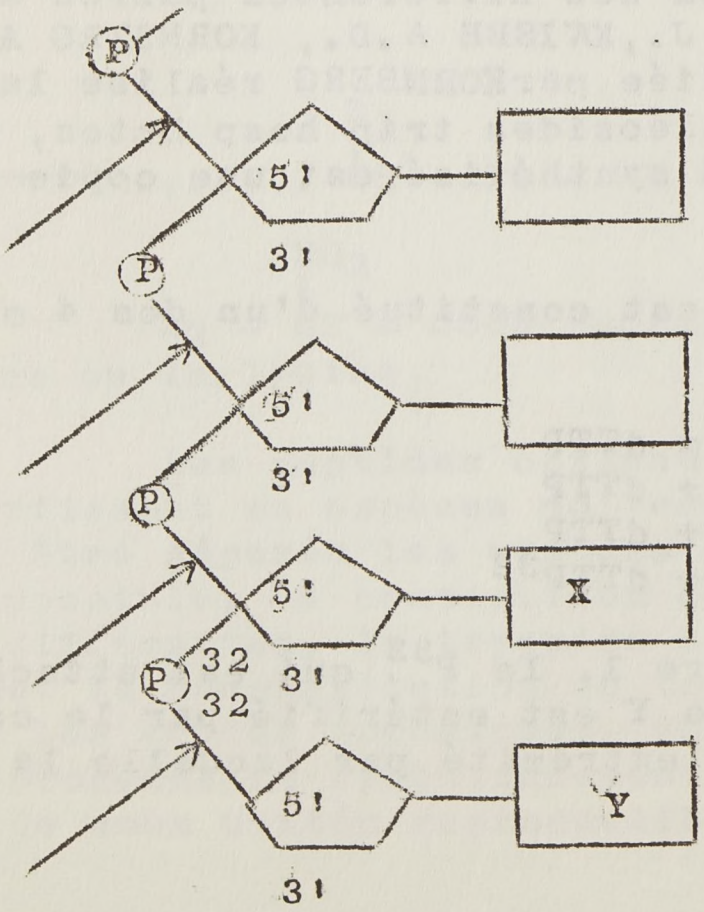


Fig.2
dégradation de la chaîne
de polynucléotides par
l'ADNase de micrococcus
et la phosphodiesticase
de veau.

On voit que le P^{32} est maintenant lié au nucléoside X La détermination du contenu en P^{32} de chacun des 4 3' mononucléotides isolés conduit à la connaissance de la fréquence de liaison de chacun des 4 nucléotides avec l'un quelconque des 4 nucléotides dans les chaînes néosynthétisées. La chaîne néosynthétisée étant une copie de la chaîne d'ADN modèle, il est possible par cette méthode de connaître la fréquence de chacune des 16 paires de nucléotides possibles. KORNBERG et COLL ont ainsi apporté une confirmation de la polarité inverse des 2 chaînes polynucléotidiques complémentaires de l'ADN impliquée par le schéma de WATSON et CRICK.

Telles sont les données analytiques que l'on possède sur l'ADN. Elles sont impuissantes a établir une correspondance entre une sé uence polynucléotidique et une séquence d'acides aminés. Toutefois, elles peuvent être confrontées utilement aux résultats obtenus grâce aux autres méthodes expérimentales.

III - METHODE GENETIQUE UTILISANT LES SUPPRESSEURS INTRACISTRONIQUES.

1) Notion de cistron et de suppresseur intracistronique

Soit deux mutations a et b affectant deux sites A et B différents

Dans le double héterozygote $\frac{a}{+}$ $\frac{+}{b}$ les deux allèles mutants sont en position trans.

Dans le double héterozygote $\frac{a}{+}$ $\frac{b}{+}$ des deux allèles mutants sont en position cis

Si le phénotype correspondant à la position trans est mutant alors que le phénotype correspondant à la position cis est sauvage, les deux sites A et B appartiennent par définition au même cistron. Si au contraire les phénotypes correspondent aux deux positions sont identiques, les deux sites A et B appartiennent à 2 cistrons différents.

Lorsqu'une mutation en un second locus rétablit chez un mutant le phénotype sauvage, l'allèle mutant en ce second locus est appelé suppresseur. On peut distinguer cette seconde mutation d'une mutation reverse, grâce à un croisement avec la souche sauvage. La descendance du croisement mutant réverse X sauvage ne comportera que des individus à phénotype sauvage. Dans la descendance du croisement mutant + suppresseur X sauvage apparaîtront par recombinaison des individus à phénotype mutant. On peut préciser la localisation du suppresseur par l'application du test

.../...

cis trans. Soit a le gène mutant et b son suppresseur

Si $\frac{a \quad b}{+ \quad +}$ possède le phénotype sauvage alors

que $\frac{a \quad +}{+ \quad b}$ possède le phénotype mutant, les deux sites

A et B appartiennent au même cistron. On parle alors de supresseur intracistronique.

C'est le mécanisme d'action de ces suppresseurs intracistroniques que CRICK et ses collaborateurs ont étudié sur les mutants rII du phage T_4.

2) La région rII du phage T_4

Le phage T_4 se développe à l'intérieur de la bacterie E. coli. Les mutants rII ne peuvent se développer à l'intérieur d'une souche K d'E.coli portant le prophage λ . Ces mutants peuvent se développer à l'intérieur d'une souche B mais leur plage présente alors un aspect caractéristique. L'infection mixte d'une bactérie B par deux stocks de phages rII peut conduire à la libération de phage recombinés sauvages. Ces recombinés sont mis en évidence par étalement sur une boîte de Petri recouverte d'un film de bactéries K (λ). Seuls les phages recombinés provoquent l'apparition de plages de lyse. On peut ainsi déceler des taux de recombinaison de l'ordre de 10^{-8} (BENZER S 1961) BENZER a fait l'analyse génétique de la région rII. Dans une fraction du génôme du phage ne dépassant pas 1/40 de la longueur totale du matériel génétique, BENZER a localisé 3.000 mutants apparus indépendamment en plus de 300 sites. L'application du test cistrans aux mutants rII a révélé la présence de deux cistrons, le cistron A et le cistron B.

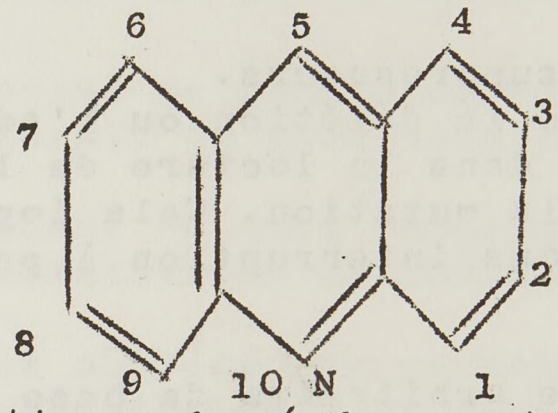
3) L'action mutagène des acridines.

Les acridines semblent avoir une action mutagène très particulière. Contrairement aux mutants spontanés ou induits par les analogues de bases, qui présentent souvent une fonction rII atténuée, les mutants induits par les acridines montrent une absence totale de la fonction rII.

De même, à la suite de l'action des acridines, seules ont pu être mises en évidence des mutations affectant des fonctions nécessaires aux phases précoces du développement du phage. Or, seules ces phases précoces peuvent donner lieu à des complémentations de phages mutants par des phages "sauvages". Par contre, la perte totale d'une fonction nécessaire à une phase tardive du développement du phage sera absolument létale et par suite non décelable. On peut donc supposer que les mutations induites par les acridines se traduisent par une perte totale de fonction (Cf BRENNER et col. 1961)

.../...

Les acridines, molécules hydrophobes très plates semblent agir en s'intercalant entre deux bases de la chaîne polynucléotidique d'ADN.



Squelette carboné des acridines.

C'est ce qui ressort de l'étude des caractères physiques de l'ADN combiné aux acridines (LERMAN 1961). Si l'acridine s'intercale entre les deux bases d'une seule des deux chaînes de la double hélice, à la replication suivante, il se produira soit l'addition, soit la délétion d'une base.

4) Existence de suppresseurs intracistroniques.

Le point de départ de l'étude de CRICK est le mutant rII P_{13} obtenu par l'action de la proflavine ou 2-8 diamino acridine (CRICK FHC et Coll. 1961). Ce mutant a été rebaptisé FCO et a pu être localisé dans la région B_1 a du cistron B. Par hypothèse, cette mutation consiste en une addition ou en une délétion d'une base; supposons que ce soit l'addition d'une base. Le retour au phénotype sauvage se fera par la délétion d'une base en un site généralement différent. Effectivement, l'analyse génétique des réversions de FCO montre que le génotype des réversés est celui d'un double mutant comportant à la fois FCO et un suppresseur de FCO. Si on donne à FCO le signe +, les suppresseurs de FCO auront le signe -. CRICK a pu ainsi localiser 18 suppresseurs de FCO. Soit un de ces mutants, FC 7 par exemple. Il a un phénotype rII typique, c'est-à-dire qu'il montre une absence totale de la fonction rII. Le retour au phénotype sauvage se fera pour ce mutant par une nouvelle mutation consistant en l'addition d'une base en un site voisin. C'est encore ce que montre l'analyse génétique : FC 7 possède 16 suppresseurs qui peuvent donc être symbolisés par (+). Un de ces suppresseurs FC 42, de phénotypes rII peut retourner au phénotype sauvage sous l'action d'une seconde mutation, le suppresseur pouvant être symbolisé par (-).

CRICK a pu ainsi isoler 80 mutants apparus spontanément comme suppresseurs de FCO, comme suppresseurs de ces suppresseurs, ou comme suppresseurs de cette dernière catégorie de suppresseurs. Ces mutants sont tous localisés au début du cistron B, dans une région couvrant moins de 1/5 des sites du cistron B.

.../...

C'est bien d'une suppression qu'il s'agit et non d'une complémentation. En effet, une infection mixte d'une bactérie K(λ) par un mutant et un phage portant un suppresseur de ce mutant ne peut aboutir à un développement du bactériophage. Or cette infection mixte réalisait la position trans du test cis-trans.

5) Mécanisme d'action des suppresseurs.

CRICK suppose que la délétion ou l'addition d'une base introduit une perturbation dans la lecture de la séquence des bases à partir du site de la mutation. Cela implique que la séquence des bases est lue sans interruption à partir du début du cistron B.

Soit une séquence arbitraire de base

ABC	ABC	ABC	ABC	ABC

figure 3

Le dessin en pointillé représente le cadre de lecture constitué par un groupe de 3 bases.

Supposons que le signal pour un acide aminé soit constitué par un groupe de 3 bases. L'addition d'une base résulte dans la lecture de la séquence représentée dans la figure 4.

	+				
ABC	AAB	CAB	CAB	CAB	C

figure 4

Le signe + représente le site d'addition de la base supplémentaire.

On voit que le résultat de cette mutation est identique à celui qu'aurait un déplacement du cadre de lecture, d'une base vers la gauche. La délétion d'une base aura pour effet un déplacement du cadre de lecture en sens inverse. La lecture normale de la séquence des bases est rétablie à partir du site du suppresseur. C'est ce qui est représenté à la figure 5 .

	+		-		
ABC	AAB	CAB	CAC	ABC	ABC

Figure 5

Dans ce dernier cas la lecture du code est perturbée dans la région comprise entre le site du mutant et celui du suppresseur.

.../...

La région couverte par l'ensemble de ces mutations doit vraisemblablement correspondre à une partie non essentielle de la chaîne peptidique dont la structure est sous la dépendance du cistronB.

Si cette série d'hypothèse est exacte on peut savoir que :

a) le croisement de deux mutants de même symbole ne fournira jamais de recombinants de phénotype sauvage.

b) le croisement de deux mutants de symbole opposé pourra fournir des recombinants de phénotypes sauvage.

c) Si on peut obtenir par recombinaison des mutants possèdant 3 bases supplémentaires, certains de ces triples mutants auront le phénotype sauvage ou pseudosauvage (fig.6)

	+		+		+	
ABC	AAB	CAB	CCA	BCA	BBC	ABC

figure 6

L'addition de trois bases aboutit au rétablissement d'une lecture normale de la séquence à partir du site d'addition de la 3ème base.

6) Existence de point d'arrêt de lecture.

La délétion r 1589 couvre la fin du cistron A et le début du cistron B. Toutefois elle n'empêche pas l'expression du cistron B. Un mutant rII déficient pour P est en effet complémenté par un bactériophage portant la délétion r 1589. Par ailleurs, par suite de la définition même du cistron, une mutation affectant le cistron A ne touchera pas le cistron B. Ceci est vrai aussi bien de P_{43} et X 142. Ces deux mutants réversent fortement sous l'action de l'acridine et ont donc vraisemblablement pour origine l'addition ou la délétion d'une base à l'intérieur du cistron A. Or si on introduit dans le même génôme la mutation P_{43} et la délétion 1589, le double mutant ainsi produit n'est pas capable de complémenter un mutant pour le cistron B. (voir figure 7).

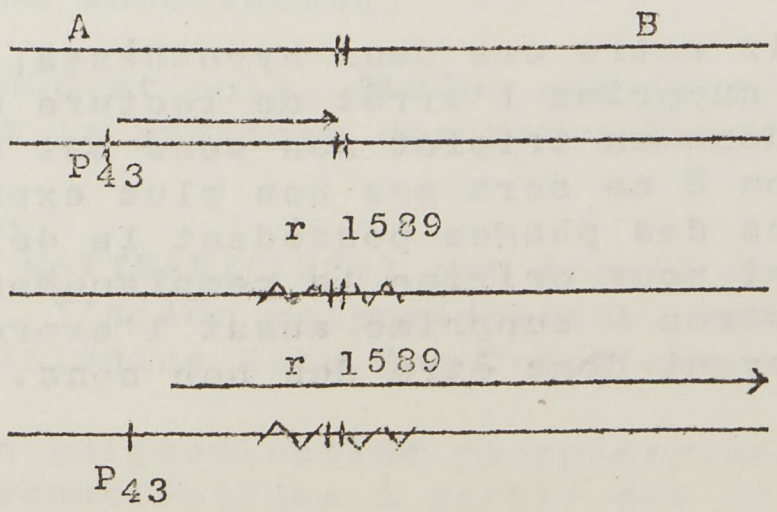


figure 7

.../...

Le double trait vertical représente le point d'arrêt de lecture, la zône couverte par la flèche correspond à la zone dans laquelle la lecture de la séquence des bases est perturbée.

La lecture erronée de la séquence des bases entraînée par l'altération du cistron A se continue dans le cistron B. La région couverte par la délétion r 1589 porte donc une structure responsable de la lecture séparée des séquences du cistron A et du cistron B.

7) Dégénérescence du code.

Les résultats des expériences de CRICK suggèrent que le code est certainement dégénéré. Si le signal pour un acide aminé est un triplet de bases, il y a 64 triplets possibles. Dans l'hypothèse d'un code non dégénéré, il y aurait 44 triplets sans signification.La possibilité même de trouver des suppresseurs relativement éloignés du site mutant est donc un argument en faveur de la dégénérescence du code.

8) Existence de triplets non sens.

La dégénérescence du code n'empèche pas l'existence de triplets non sens. (CHAMPE et BENZER 1962 - BENZER et CHAMPE 1962).

La délétion r 1589 n'empêche pas l'expression du cistron B. Il est donc vraisemblable que la portion du cistron B couverte par la délétion r I589 contrôle la synthèse d'une fraction non essentielle de la chaîne polypeptidique B. Or certaines mutations r II couvertes par cette délétion semblent être dûes au remplacement d'une base par une autre base donc à l'altération d'un triplet. 2 hypothèses peuvent expliquer ces faits expérimentaux.

a) Quoique la région couverte par la délétion 1589 ne soit pas essentielle, le remplacement d'un acide aminé dans la région correspondante de la protéine conduit à une perte de fonction de cette protéine. Le remplacement d'un acide aminé peut par exemple modifier la configuration spatiale de la protéine.

b) Le remplacement d'une base dans un triplet produit un non-sens. Il y a par suite dn arrêt dans la lecture de la séquence des bases.

Pour choisir entre ces deux hypothèses, BENZER a utilisé la délétion 1589 qui supprime l'arrêt de lecture entre le cistron A et le cistron B. Si donc un triplet non sens est produit dans le cistron A, la fonction B ne sera pas non plus exprimée. On observe effectivement que dans des phages possèdant la délétion 1589, certaines mutations ayant pour origine le remplacement d'une base par une autre dans le cistron A supprime aussi l'expression du cistron B. Certains triplets peuvent donc être des non sens.

.../...

9) Conclusions

Des expériences de CRICK et BENZER sur le mécanisme de lecture du code on peut tirer les conclusions suivantes :

a) La lecture de la séquence des bases d'un cistron se poursuit sans interruption à partir d'un point fixe jusqu'à un point d'arrêt de lecture.
b) Le signal pour un acide aminé est constitué par un groupe de 3 bases (ou d'un multiple de 3)
c) Le code est probablement dégénéré.
d) Il existe des triplets non-sens.

Une des hypothèses de départ que nous n'avons pas mentionnée mais qui se trouve confirmée par les travaux faits sur la mosaïque du tabac (cf. TSUGITA 1962) est le non chevauchement du code.

On ne connaît malheureusement pas la protéine dont la synthèse est contrôlée par le gène rII/ La connaissance de cette protéine apporterait la confirmation des hypothèses faites sur l'action mutagène des acridines

Les mutants induits par l'action de l'acridine produisent ils une protéine rII modifiée et par suite non fonctionnelle ?

Ou au contraire y-a-t-il apparition, sous l'effet du déplacement du cadre de lecture, de triplets non sens provoquant un arrêt de lecture et une non production totale de protéine.

IV - LES POLYRIBONUCLEOTIDES SYNTHETIQUES ET LE CODE.

L'utilisation de méthodes purement génétiques a donc permis de connaître un certain nombre de caractéristiques du mécanisme de lecture de l'information génétique. Pour aller plus avant, c'est-à-dire pour faire correspondre à chaque triplet un acide aminé, il faut pouvoir réaliser la synthèse des protéines sous le contrôle de signaux connus. Cela a été rendu possible par deux découvertes.

1) GRUNBERG MANAGO et coll. (1956) ont isolé et purifié une enzyme réalisant la synthèse des polyribonucléotides de composition connue.

2) NIRENBERG et MATTHAEI(1961) ont trouvé que l'un de ces polyribonucléotides, l'acide polyuridylique, stimulait l'incorporation de phénylalanine dans des fractions subullulaire d'E coli.

1 - La polynucléotide phospherylase réalise la synthèse de polyribonucléotides à partir des nucléosides pyrophosphorylés

.../...

Le modèle de la réaction est

$$n\ X\ R\ P\ P \rightleftharpoons (X\ R\ P)\ n + n\ P$$

où X est une base purique ou pyrimidique..

La réaction peut s'effectuer soit sur un substrat homogène, soit sur un mélange des 4 nucléosides pyrophosphorylés. Dans ce cas, la séquence des bases du polyribonucléotide synthétisé est une séquence aléatoire. La fréquence de chaque base dans la séquence est égale à la proportion du nucléoside pyrophosphorylé correspondant dans le mélange réactif. La proportion des différents triplets possibles est donnée par la loi de probabilité multinomiale à 3 variables. Le nombre de résidus d'une chaîne synthétisée varie de 30 pour le polymère des 4 nucléosides à 230 pour l'homopolynucléotide de l'adenosyl ribose pyrophosphate, A la différence des polymorases isolées ultérieurement par KORNBERG et par HURWITZ, pp. synthétase de GRUNBERG MANAGO et coll. ne nécessite pas la présence d'un modèle.

2 - NIRENBERG et MATTHAEI ont étudié les propriétés d'extraits cellulaires d'E.coli réalisant l'incorporation in vitro des acides aminés dans une fraction protéique . Les caractéristiques de cette incorporation suggèrent son identité avec la synthèse des protéines in vivo. En effet le système est fortement inhibé par l'ARNase, la puromycine et la chloromycétine qui sont reconnus comme des inhibiteurs de la synthèse protéique in vivo. L'incorporation d'un des acides aminés marqués est fortement stimulée par un mélange des 20 acides aminés. Enfin l'ADNase, sans action sur le taux d'incorporation initial, a une action inhibitrice marquée au bout d'un certain temps. Il faut supposer, pour expliquer cette cinétique, que l'ADN contrôle l'incorporation des acides aminés marqués par l'intermédiaire d'une autre substance sur laquelle l'ADNase n'agit pas.

L'hypothèse de l'existence d'une substance jouant le rôle d'intermédiaire entre l'ADN et la synthèse des protéines a été faite pour rendre compte des phénomènes de régulation du métabolisme cellulaire. (JACOB et MONOD 1961) Cet intermédiaire a été identifié avec une classe spéciale d'ARN. Seul cet ARN est synthétisé dans des bactéries infectées par le phage T_2 (VOLKIN et ASTRACHAM 1957). Sa composition en bases reproduit celle de l'ADN du bactériophage. On l'a appelé ARN messager et on suppose que c'est lui qui sert de modèle lors de la synthèse des protéines. NIRENBERG et MATTHAEI(1961) ont donc eu l'idée d'ajouter aux extraits d'E coli, après action de l'ADNase, des acides ribonucléiques provenant de différentes sources Ils ont constaté que l'acide polyuridylique synthétisé par l'enzyme de GRUNBERG MANAGO et coll. stimule l'incorporation de phénylalamine. depuis cette découverte, on s'est efforcé de connaître le signal correspondant à chaque acide aminé. (MATTHAEI et coll. 1962. SPEYER et coll. 1962).

METHODE

On fournit à l'enzyme de GRUNBERG MANAGO et coll., un substrat formé d'un mélange de composition variable des 4 nucléosides pyrophosphorylés. Le polyribonucléotide ainsi synthétisé sert ensuite

.../...

d'ARN messager aux extraits d'E coli. On note le taux d'incorporation des différents acides aminés par ce système. Dans l'exemple 1 NIRENBERG et MATTHAEI (MATTHAEI et coll 1962) ont fourni à la polyribonucléotide phosphorylase un substrat formé de 0,87 parts d'uridine pyrophosphorylée pour 0,13 d'adénosine pyrophospherylée.

Proportion URPP 0,87
ARPP 0,13

fréquences des différents triplets possibles

UUU	100
UUA	13
UAA	2,2
AAA	0,3

taux d'incorporation observés pour les différents acides aminés

Phe	100
arg	0
Ser	0,4
Ala	1,9
Pro	0
Tyr	13
iLeu	12
Val	0,6
Leu	4,9
cys-SH	4,9
Trypt	1,1
Gly	4,7
met	0,6
glu	1,6

E x 1

L'incorporation de phenylalanine dont on sait qu'elle est stimulée par le triplet UUU sert d'étalon pour chaque expérience.

Dans l'exemple donné, on conclut de l'examen des taux d'incorporation que le triplet UUA constitue le signal à la fois pour la tyrosine et l'isoleucine.

RESULTATS OCHOA et coll. ont ainsi déterminé les différents signaux pour 19 aa (SPEYER et col 1962) NIRENBERG et MATTHAEI pour 15 aa. (MATTHAEI et col. 1962). Le tableau 1 donne les résultats de ces recherches :

.../...

AA	triplet correspondant	Laboratoire qui a établi la correspondance	
Phe	UUU	N.	O
Arg	UCG	N.	O
Ala	UCG	N.	O
Ser.	UUC	N.	O
	UCG		O
Pro	UCC	N.	O
tyr	UUA	N.	O
Ile	UUA	N	O
Val	UUG	N	O
Leu.	UUC	N	O
	UUG	N	O
	UUA		O
cys. SH	UGG	N	O
	UUG		O
trypt.	UGG	N	O
gly	UGG	N	O
Met	UGA	N	O
glu	UGA	N	O
Lys	UAA	N	O
Aspn	UAA		O
	UAC		
His.	UAC		O
Asp	UAG		O
there	UAC		O
	UCC		

N représente le laboratoire de NIRENBERG et MATTHAEI
O représente le laboratoire de OCHOA et coll.

De l'examen du tableau 1 il ressort que les différences entre les résultats des deux groupes de chercheurs sont minimes.

Dégénérescence du code. Il y a au moins deux triplets et peut-être trois qui stimulent l'incorporation de leucine. Le code est donc au moins en partie dégénéré.

Existence de non sens. L'acide polyadénylique ne semble stimuler l'incorporation d'aucun acide aminé. Le triplet AAA doit donc être un non sens.

Difficultés de la méthode. La séquence des bases dans les polyribonucléotides synthétiques est une séquence aléatoire. Il subsiste donc deux catégories d'incertitudes.

D'une part, on ne peut établir qu'une corrélation entre une fréquence théorique des différents triplets possibles et un taux relatif d'incorporation d'un acide aminé donné.

D'autre part, il est vraisemblable que l'ordre des bases joue un rôle dans la signification de chaque triplet. Or la méthode employée ne permet pas de connaître l'ordre des bases dans un

.../...

triplet de composition donnée.

De plus chacun des triplets stimulant l'incorporation d'un acide aminé comporte au moins 1 U. Ce résultat est en contradiction apparente avec la proportion de G + C déterminée analytiquement dans l'ADN et qui peut atteindre 72%. Une des explications avancées (cf CHANTRENNE 1963) est que les polyribonucléotides synthétiques contenant de l'uracile présentent un avantage dû aux conditions expérimentales. On a en effet observé que la majeure partie des polyribonucléotides ajoutés aux extraits d'E coli disparaissait en quelques minutes. Seule une faible fraction joue effectivement le rôle d'un ARN messager grâce à un attachement rapide aux ribosomes. Il est possible que dans cette phase les polyribonucléotides riches en uracile possèdent un avantage venant soit de leur configuration spatiale, soit de leur solubilité. Nous verrons plus loin l'explication donnée par WOESE à la présence constante d'uracile parmi les bases des différents triplets.

V - UNIVERSALITE DU CODE

L'acide polyribonucléique synthétique fourni aux extraits d'E coli joue le rôle d'un ARN messager. Si le code est universel, la nature de la protéine synthétisée sous le contrôle de l'ARN messager fourni au système ne doit dépendre que de l'information contenue dans cet ARN et non du système réalisant le transfert de l'information. NIRENBERG et MATTHAEI (1961) ont constaté que de l'ARN provenant de différentes sources stimulait l'incorporation d'acides aminés par les extraits d'E.coli. En particulier, l'ARN de la mosaïque du Tabac stimule par un facteur 75, l'incorporation dans une fraction protéique d'acides aminés marqués au C^{14}. Or on sait que la structure primaire de la protéine de la mosaïque du tabac est déterminée par l'information portée par l'ARN viral (TSUGITA et FRAENKEL CONRAT 1962). On a donc comparé par différentes méthodes la protéine radioactive synthétisée in vitro par des extraits d'E coli sous le contrôle de l'ARN du virus de la mosaïque du tabac avec la protéine de virus apparu in vivo. (TSUGITA, FRAENKEL, CONRAT, NIRENBERG et MATTHAEI 1962) On a trouvé qu'au moins une fraction de la protéine synthétisée in vitro était semblable à la protéine du virus de la mosaïque du tabac. Dans chaque expérience, on utilise pour l'isolement de la protéine synthétisée in vitro une protéine de MT jouant le rôle d'entraineur.

a) Précipitation de la protéine par un sérum anti MT. Du fait de la présence de protéine de M.T. utilisée comme entraîneur, il peut se produire une précipitation non spécifique de radioactivité par adsorption de substances radioactives sur le complexe protéine serum anti. On fait donc l'expérience contrôle suivante. On fournit aux extrait d'E.coli un ARN de levure. Après incubation, on ajoute de la protéine de mosaïque de Tabac et du sérum anti M.T. La radioactivité est dans ce cas le

.../...

1/3 environ de la radioactivité précipitée lorsqu'on fournit aux extraits d'E.coli, de l'ARN du virus de la mosaïque du tabac. L'ARN viral est donc bien responsable de la synthèse d'une protéine précipitée de manière spécifique par le sérum anti M.T.

b) Reconstitution de particules virales infectieuses. On ajoute à la protéine S synthétisée in vitro sous le contrôle de l'ARN de M.T., une quantité P de protéine de M.T. jouant le rôle d'entraîneur. Après isolement et purification, on fait incuber la protéine P + S avec de l'A.R.N. du virus M.T. Une fraction correspondant à 3 ou 4% de la protéine totale P + S reconstitue des particules virales complètes. Dans l'expérience contrôle, la synthèse protéique est stimulée par de l'ARN d'E.coli. La proportion de protéine P reconstituant des particules virales complètes est alors de 30 à 40 % soit dix fois plus que dans l'expérience précédente. Toutefois lorsque c'est l'ARN de MT qui est utilisé comme ARN messager, la radioactivité des particules infectieuses reconstituées est 10 fois plus forte que dans l'expérience témoin.

Ces deux résultats apparemment contra dictoires suggèrent que :

i) une fraction de la protéine radioactive synthétisée in vitro, reconstitue des particules virales infectieuses. C'est cette fraction qui est responsable de l'incorporation de radioactivité dans les particules virales mûres.

ii) La protéine synthétisée in vitro interfère avec la protéine normale de M.T. lors de la reconstitution de particules complètes. Cette interférence ne peut s'expliquer que par une analogie de structure entre la protéine synthétisée in vitro et la protéine P utilisée comme entraîneur.

c) Analyse tryptique de la protéine radioactive synthétisée.

L'analyse tryptique de la protéine de la mosaïque du Tabac fournit 12 peptides, 11 de ces peptides sont solubles et séparables par chromatographie. Lorsque le seul acide aminé marqué fourni aux extraits d'E coli est la phénylalanine, les peptides solubles 3 4 6 12 contiennent 78% de la radioactivité totale. Or seuls ces peptides contiennent de la phénylalanine. La chromatographie a toutefois permis de déceler des peptides radioactifs qui ne sont pas normalement présents dans la protéine de la mosaïque du tabac. Dans des expériences identiques menées avec de la tyrosine marquée, on n'a pas pu déceler la N acétyl-séryltyrosine dans le peptide 1 dont cette séquence forme pourtant le début. Cette absence d'extrêmité acétylée pourrait être en relation avec le faible taux de reconstitution de particules virales complètes.

d) Conclusion.

Une fraction du matériel protéique synthétisé en présence de l'ARN du virus de la mosaïque du tabac est semblable sinon tout à fait identique à la protéine enveloppe du virus. Le code est donc

.../...

au moins en partie universel. La présence des peptides radioactifs supplémentaires après hydrolyse trypsique de la protéine synthétisée suggère que l'ARN du virus de la mosaïque du tabac porte l'information pour plusieurs protéines.

VI - LES MUTANTS DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC : LE NON CHEVAUCHEMENT DU CODE ET LES DONNEES DE REMPLACEMENT.

L'acide ribonucléique du virus de la mosaïque du tabac portant l'information nécessaire à la synthèse de la protéine enveloppe, les modifications de l'acide ribonucléique se traduiront par une altération de la protéine enveloppe.

L'acide nitreux agit en désaminant les bases puriques et pyrimidiques. Il désamine la cytosine en uracile et l'adénine en hypoxanthine qui a les mêmes propriétés électroniques que la guanine. Son action désaminante sur la guanine ne se manifeste pas par un effet mutagène.

L'étude des mutants du virus de la mosaïque du tabac induits par l'acide nitreux a mené aux conclusions suivantes :

1 - Le code n'est pas chevauchant, c'est-à-dire qu'une base ne fait partie que d'un seul triplet.
2 - Les remplacements d'acides aminés s'observent toujours dans un sens déterminé et peuvent être groupés en lignées.

1) Le code n'est pas chevauchant.

Le laboratoire de FRAENKEL CAURAT a analysé la protéine mutante de 11 mutants du virus de la mosaïque du tabac induits par l'acide nitreux (TSUGITA 1962). Sur ces 11 mutants

3 montrent le remplacement d'un seul acide aminé
4 montrent le remplacement de 2 acides aminés
2 montrent le remplacement de 3 acides aminés
2 montrent le remplacement de 16 acides aminés.

Dans cette dernière catégorie, la composition des peptides trypsiques des souches mutantes se rapproche de la souche mutante spontanée G T A M V. On pense que l'action mutagène primaire de l'acide nitreux a eu pour résultat une diminution de la stabilité de la souche mutante. Par suite, le taux de mutations dans cette souche a augmenté fortement et la sélection a favorisé la souche ayant la plus grande stabilité. C'est pourquoi cette souche ressemble à une souche spontanée.

En fait, seuls nous intéressent ici les mutants montrant le remplacement de 2 ou 3 acides aminés et qui sont vraisemblablement induits par l'action mutagène primaire de l'acide nitreux. Si le code était chevauchant, la modification d'une base entraînerait le remplacement de plusieurs acides aminés voisins. En fait les remplacements d'acides aminés observés n'affectent jamais le même peptide et quand ils affectent 2 peptides voisins les acides aminés touchés ne sont jamais voisins.

.../...

2) Les données de remplacement et le code (WITTMANN H.G.1960) (TSUGITA 1962)

Certains des groupes de filiation apportent une confirmation aux résultats de MATTHAEI et coll. et de SPEYER et coll. On a en effet observé à la suite de l'action mutagène de l'acide nitreux le remplacement de la thréonine par la sérine et de la sérine par la phénylalanine et on n'a jamais observé les remplacements inversés. Or (voir tableau 1) 1 des triplets correspondant au signal de la thréonine est UCC, 1 des triplets correspondant au signal de la sérine est UUC. La phénylalanine est incorporée sous le contrôle du triplet UUU. Le contenu en uéracile de chacun de ces 3 signaux va croissant du signal de la thréonine au signal de la phénylalanine. Sous l'action désaminante de l'acide nitreux, il peut donc y avoir transformation de UCC en UUC et de UUC en UUU (1) C'est en utilisant les données de remplacement que WOESE a construit un code dégénéré qui tient compte de l'ordre des bases dans chaque triplet.

VII - LE CODE DEGENERE DE WOESE (1962)

WOESE a pris comme hypothèse de travail que le code devait être dégénéré au maximum. La dégénérescence du code est en effet suggéré par les expériences de CRICK (1961) et par les expériences d'incorporation d'acidesaminésin vitro en présence de polyribonucléotides synthétiques (S. MATTHAEI et coll.1962, SPEYER et coll. 1962). D'autre part seul un code dégénéré peut rendre compte des larges variations du rapport $\frac{G + C}{A + T}$ (SUEOKA 1961). Que le code soit dégénéré au maximum, cela veut dire que la quantité d'information portée par un triplet est aussi voisine que possible de la quantité d'information nécessaire au codage d'un acide aminé.

WOESE admet que la quantité d'information portée par chacune des bases d'un triplet n'est pas la même et que cette information a pour support matériel le choix entre les différents substituants des bases en position 2 et 6.

Rappelons la nature des substituants en position 2 et 6 pour chacune des bases.

l'uracile est	2 O H	6 O H
la guanine est	2 NH_2	6 O H
L' adénine est	2 H	6 NH_2
la cytosine est	2 O H	6 NH_2

---

(1) - Toutefois, il convient de signaler que ces groupes de filliation n'ont pas été établis à partir des remplacements successifs affectant la même position dans la séquence des acides aminés de la protéine de M.T. mais à partir de remplacements affectant des positions différentes. Comme plusieurs triplets peuvent avoir la même signification, la restriction que nous venons de faire enlève aux données de remplacement une partie de leur valeur de confirmation.

.../...

La position 2 porte donc une quantité d'information correspondant au choix entre 3 substituants possibles. La position 6 porte une quantité d'information correspondant au choix entre 2 substituants possibles. L'information portée par l'ensemble des positions 2 et 6 correspond au choix entre 4 éventualités.

Supposons que la première base d'un triplet porte l'information correspondant à la position 2 , la seconde l'information correspondant à l'ensemble des positions 2 et 6, la troisième l'information correspondant à la position 6 ; un triplet de bases porte donc l'information correspondant au choix entre 3 X 4 X 2 = 24 éventualités.
Il y a 20 acides aminés. S'il y a un signal pour le début d'un cistron et un signal pour la fin d'un cistron, il y a 22 signaux nécessaires. La quantité d'information portée par un triplet est donc très voisine de la quanfité d'information nécessaire à la synthèse des protéines.

La première base d'une triplet peut-être indifféremment la cytosine ou l'uracile sans que le triplet change de sens puisque ces deux bases portent le même substituant en position 2. De même la troisième base peut-être indifféremment l'adénine ou la cytosine d'une part, l'uracile ou la guanine d'autre part sans que le triplet change de sens. Les triplets UGC, UGA, CGC et CGA ont donc la même sugnification.

En tenant compte des données de remplacement fournies par l'étude des mutants de la mosaïque du tabac, WOESE a établi l'ordre des bases dans les triplets de composition connue. Il a de plus donné les triplets équivalents pour le codage du même acide aminé. Pour chaque acide aminé il y a au moins deux triplets équivalents. Grâce au code de WOESE, on peut expliquer les variations du rapport $\frac{G + C}{A + T}$, la même protéine pouvant être codée soit par un ensemble de triplets riches en uracile, soit par un ensemble de triplets pauvres en uracile.

Certaines données de remplacement toutefois sont irréconciliables avec le code de WOESE. D'autre part, l'équivalence des triplets ayant la même signification ne reçoit pas d'explication biochimiques.

VIII - LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES ET l'ARN DE TRANSFERT.

La transmission de l'information génétique de l'ADN aux protéines se fait à travers les réactions de la synthèse des protéines. Au cours de cette synthèse intervient une catégorie spéciale d'A.R.N., l'ARN de transfert. C'est par l'intermédiaire de l'ARN tranfert que les acides aminés sont incorporés dans une chaîne polypeptidique suivant une séquence contrôlée par l'ARN messager.

.../...

L'ARN de transfert s'est révélé un des éléments essentiels dans le mécanisme de la transcription de l'information génétique. Il est doublement spécifique à la fois d'une espèce moléculaire d'acide aminé et d'une séquence de bases de l'ARN messager. C'est donc lui qui opère le décodage ou passage du language séquence de bases au language séquence d'acides aminés.

1 - Propriétés générales de l'ARN de tranfert.

L'ARN de transfert ou ARN s est un acide ribonucléique de faible poids moléculaire. Sa constante de sédimentation varie entre 3,5 et 4,5. Chaque chaîne comprend entre 70 et 100 résidus Les séquences d'ARN s, du fait de leur faible longueur, sont donc les séquences d'acide nucléique les plus faciles à analyser.

La première étape de biosynthèse des protéines consiste dans l'activation des acides aminés sous l'action d'une enzyme, une aminoacyl - RNA synthétase. Cette réaction s'effectue en deux temps :

Dans le premier temps, il se forme une liaison riche en énergie entre l'acide aminé et l'acide adénylique.

$$ATP + AA + Enzyme \longrightarrow Enzyme\ AMP - AA + PP \quad (1)$$

la liaison formée au cours de cette réaction est une liaison riche en énergie.

Dans le second temps, l'acide aminé ainsi activé est lié à l'ARN avec transfert de la liaison riche en énergie.

$$Enzyme\ AMP - AA + ARN \rightleftharpoons ARN_s - AA + AMP + Enzyme \quad (2)$$

2 - Hétérogénéité de l'ARN de transfert.

Pour une préparation donnée d'ARN de transfert, le taux de liaison des acides aminés avec l'ARN, mesuré en millimicromoles d'acide aminé par micromole de nucléotide diffère d'un acide aminé à un autre.

2 hypothèses pourraient rendre compte de cette différence

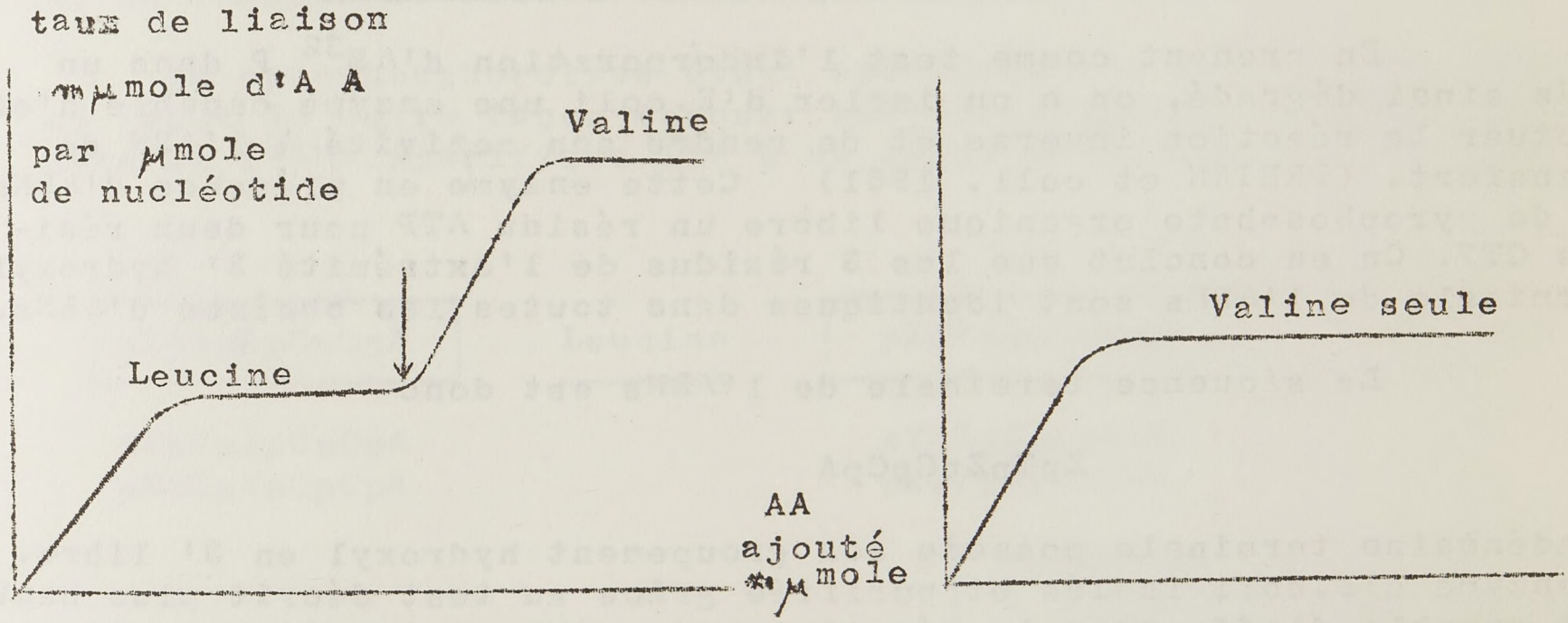
a) l'ARN de transfert constitue une espèce moléculaire homogène Les variations du taux de liaison suivant la nature de l'acide aminé résultent de différences d'affinité entre les acides aminés, pour l'ARN de transfert.

b) L'ARN de transfert est en fait constitué d'une collection d'espèces moléculaires. Chacune de ces espèces se lie à un acide aminé unique.

C'est cette dernière hypothèse qui a été confirmée. En effet : Si on ajoute progressivement à une préparation d'ARN de transfert un acide aminé déterminé, par exemple la leucine, la quantité d'ARN aminoacide formé augmente jusqu'à atteindre une valeur plateau

.../...

Si on ajoute alors à la préparation un second acide aminé, par exemple la valine, la quantité d'ARN aminoacide formé augmente à nouveau pour atteindre un second plateau. La différence entre les valeurs de ces deux plateaux est égale au taux de liaison maximum qu'on observe en ajoutant à une préparation identique d'ARNs le second acide aminé seul. Ainsi l'ARN de transfert peut-il être saturé en leucine sans que le taux de liaison d'un second acide aminé avec cet ARN de transfert s'en trouve modifié (BERG et coll. 1961).



cinétique de l'apparition des liaisons ARN aminoacide

On peut voir sur ce graphique que la courbe représentant la formation de valyl ARN est la même, que la valine soit ajoutée seule ou qu'elle soit ajoutée à un ARNs déjà saturé en leucine.

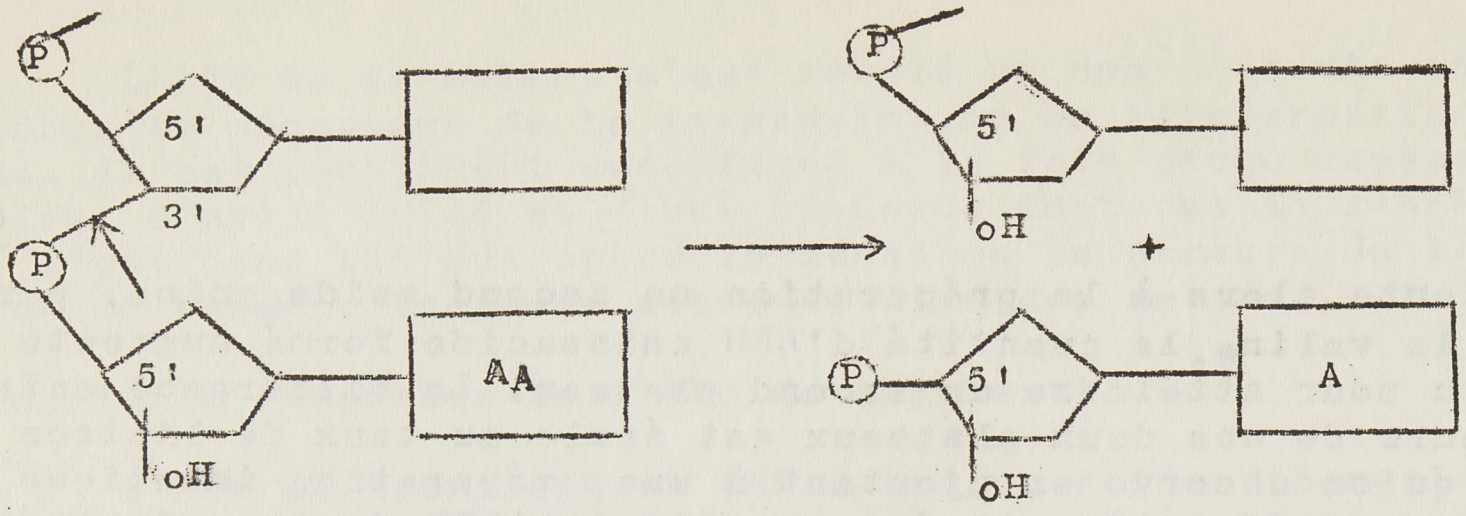
De plus il n'y a aucune corrélations entre les valeurs plateaux relatives à 2 acides aminés dans plusieurs préparations d'ARN.

3 - L'analyse de la séquence de l'ARNs et la spécificité de l'activation des acides aminés.

Une fois reconnue l'hétérogénéité des préparations d'ARNs on a cherché à trouver dans la séquence des bases de cetacide ribonucléique l'explication moléculaire de son hétérogénéité.

La phosphodiestérase de venin de serpent coupe les chaîne d'acide ribonucléique entre le phosphore et la position 3' du ribose. En présence d'ARNs, elle libère 1 résidu adénylique en même temps qu'elle supprime la propriété activatrice de l'ARN de transfert.

.../...



action de la phosphodiesterase
de venin de serpent sur l'ARNs

En prenant comme test l'incorporation d'AM^{32} P dans un ARNs ainsi dégradé, on a pu isoler d'E.coli une enzyme capable d'effectuer la réaction inverse et de rendre son activité à l'ARN de transfert. (PREIES et coll. 1961) Cette enzyme en présence d'ARNs et de pyrophosphate organique libère un résidu ATP pour deux résidus CTP. On en conclut que les 3 résidus de l'extrémité 3' hydroxyl terminale de l'ARNs sont identiques dans toutes les chaînes d'ARNs.

La séquence terminale de l'ARNs est donc

XpYpZpCpCpA

L'adénosine terminale possède son groupement hydroxyl en 3' libre. L'enzyme d'E.coli isolée et purifiée grâce au test décrit plus haut est capable d'effectuer la réaction reversible suivante qui est une pyrophosphorolyse.

(1)... XpYpZpCpCpA + 3PPi $\rightleftharpoons$ ... XpYpZp + 2CTP + ATP

Cette enzyme semble spécifique des ARN ayant pour séquence terminale pCpCpA. En effet les résidus suivants de la séquence ne sont pas touchés. On peut en utilisant la réaction inverse de la réaction (1) marquer les deux résidus cytidylique de la séquence terminale de l'ARNs (LAGERKVIST et BERG 1962).

En présence de CT^{32}P on observe la réaction 2

(2) ... XpYpZ + 2 CT ^{32}P $\rightleftharpoons$ ... YpYpZ^{32}pC^{32}pC + 2PPi

L'hydrolyse ménagée de l'ARN ainsi marqué fournit un certain nombre de polynucléotides. Les polynucléotides marqués sont ceux qui contiennent un résidu cytidylique terminal par exemple

Z^{32}p C^{32}pC ou XpYpZ^{32}pC

La séparation et l'analyse de ces polynucléotides marqués permet de connaître les séquences adjacentes à la séquence terminale et on a trouvé une grande hétérogénéité parmi ces séquences. Ainsi la spécificité de l'ARNs semble résider dans la séquence adjacente à la séquence des 3 résidus terminaux.

.../...

Une modification des conditions de la réaction de pyrophosphorolyse a permis d'aller plus loin et a fourni une méthode élégante d'analyse de la séquence terminale d'un ARNs spécifique d'un acide aminé. L'oxydation par le périodate du ribose terminal (ayant son CH en 3' libre) puis une hydrolyse catalysée par les amines suivie d'une hydrolyse alcaline a pour effet de libérer l'adénosine terminale. Le résidu terminal d'un ARN ainsi dégradé est une cytidine estérifiée en 3' par un acide phosphorique. Lorsque la position 3' du ribose terminal est au contraire estérifiée par un acide aminé, la même suite de réaction a pour seul effet de libérer l'acide aminé de la combinaison aminoacyl-ARNs et de laisser le résidu adénylique terminal libre.

La pyrophosphorolyse étant spécifique de la séquence pCpCpA on peut de cette façon marquer sélectivement la séquence terminale de l'ARN spécifique lié à un acide aminé donné (Voir tableau 2

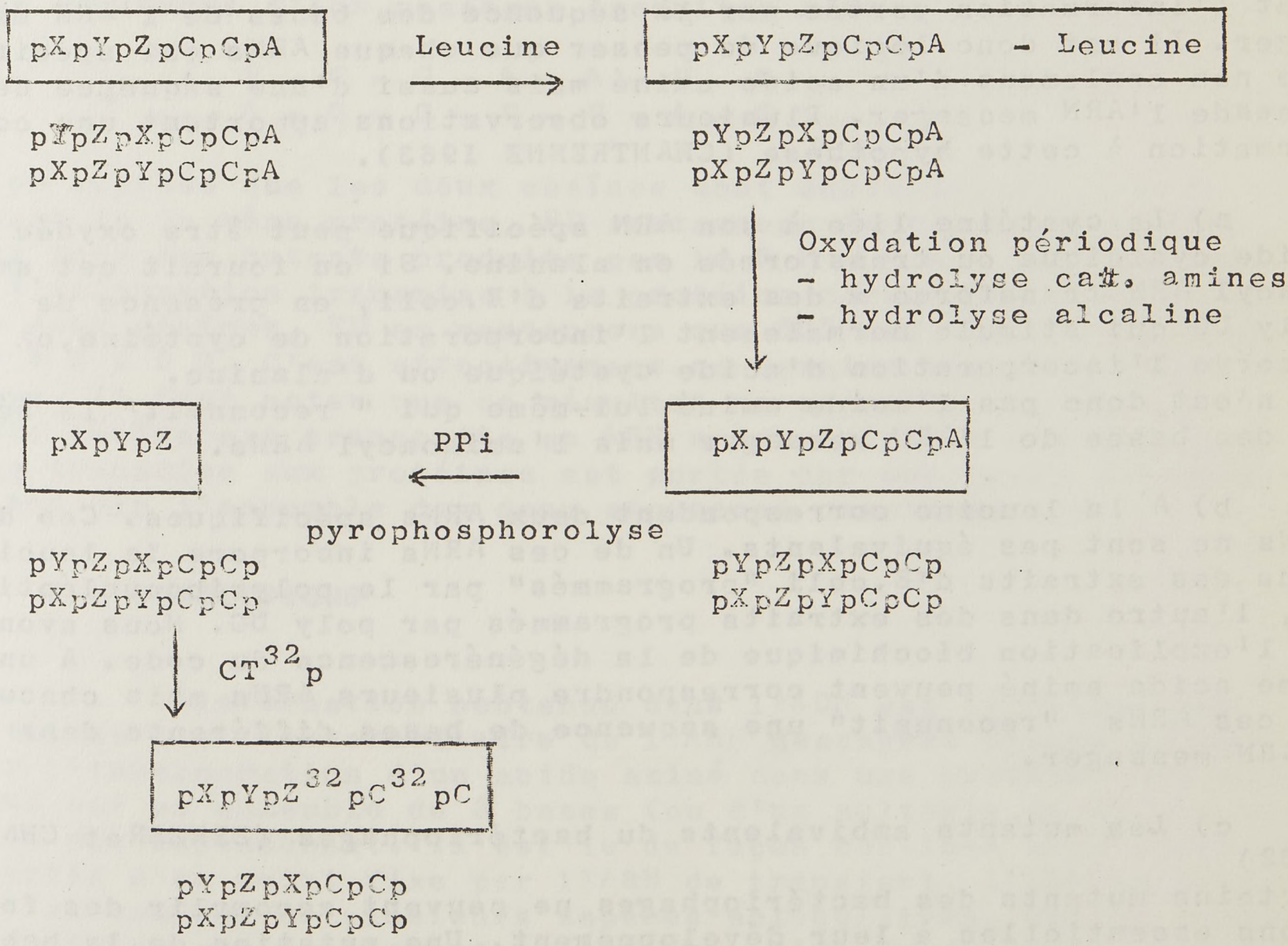


Tableau n° 2 : Marquage sélectif de la séquence terminale de l'ARNs spécifique de la leucine.

A la préparation d'ARNs on ajoute la leucine en excès puis on effectue sur ce mélange de leucyl ARNs et d'ARNs la suite de réactions décrites dans le tableau 2. L'analyse des polynucléotides marqués après hydrolyse ménagée permet de connaître la séquence terminale de l'ARNs spécifique de la leucine (BERG et al 1962)
On a trouvé deux séquences terminales différentes pour la leucine

... pGpCpApCpCpA
et ... pGpUpApCpCpA

Pour l'isoleucineon a trouvé la séquence terminale

... pGpCp (UpC)pApCpCpA

4 - La lecture du code par l'ARNs, la double spécificité de l'ARNs et les mutants ambivalents du bactériophage.

Le rôle de l'ARNs est d'assembler les acides aminés suivant l'information portée par la séquence des bases de l'ARN messager. Il est donc logique de penser que chaque ARNs est spécifique non seulement d'un acide aminé mais aussi d'une séquence de bases de l'ARN messager. Plusieurs observations apportent une confirmation à cette hypothèse (CHANTRENNE 1963).

a) La cystéine liée à son ARN spécifique peut être oxydée en acide cystéique ou transformée en alanine. Si on fournit cet aminoacyl ARN transforme à des extraits d'E.coli, en présence de poly UG qui stimule normalement l'incorporation de cystéine, on observe l'incorporation d'acide cystéique ou d'alanine.
Ce n'est donc pas l'acide aminé lui-même qui " reconnait" la séquence des bases de l'ARN messager mais l'aminoacyl ARNs.

b) A la leucine correspondent deux ARNs spécifiques. Ces deux ARNs ne sont pas équivalents. Un de ces ARNs incorpore la leucine dans des extraits d'E.coli "programmés" par le polyribonucléotide UC, l'autre dans des extraits programmés par poly UG. Nous avons là l'explication biochimique de la dégénérescence du code. A un même acide aminé peuvent correspondre plusieurs ARNs mais chacun de ces ARNs "reconnait" une séquence de bases différente dans l'ARN messager.

c) Les mutants ambivalents du bactériophages (BENZER et CHAMPE 1962)
Certains mutants des bactériophages ne peuvent accomplir des fonctions essentielles à leur développement. Une mutation de la bactérie hôte peut rétablir la fonction du bactériophage. Le phénomène remarquable est que cette mutation de la bactérie rétablit le phénotype pseudosauvage pour toute une série de gènes du bactériophage non liés topographiquement. L'interprétation donnée est que cette mutation modifie la structure moléculaire d'un ARN de transfert. L'ARN de transfert mutant lit un signal là où il y avait un triplet non sens.

.../...

IX - LA SYNTHESE DE L'ARN MESSAGER

L'ADN est constitué d'une double chaîne polynucléotidique. L'ARN messager ne comporte qu'une seule chaîne polynucléotidique. Au moment de la transcription de l'information ADN en ARN messager, l'information transmise sous forme d'ARN provient-elle d'une seule séquence ou des deux séquences complémentaires d'ADN ? BENZER a abordé ce problème en utilisant le 5 fluorouracile (FU) (CHAMPE et BANZER 1962 bis). Cette substance s'incorpore dans l'ARN messager à la place de l'uracile. Mais ses propriétés électroniques se rapprochent de celles de la cytosine et on pense qu'elle a la même signification que la cytosine. Par ailleurs l'action mutagène de la 5 bromodésoxyuridine s'explique par le remplacement d'une paire de bases GC par une paire AT. Supposons qu'il y ait 4 paires AT ainsi produites dans une séquence d'ADN.

... A - G - C - T - T - A - C ...
... T - C - G - A - A - T - G ...

Si l'ARN reçoit l'information de chacune des deux chaînes, les deux séquences d'ARN messager produites seront

... U - C - G - A - A - U - G ...
... A - G - C - U - U - A - C ...

Si on suppose que les deux chaînes sont équivalentes pour le codage de la même protéine, FU restaurera la fonction altérée chez tous les mutants produits par le 5 B U D R . Dans le cas où l'information transmise à la protéine correspond à une seule des deux chaînes, FU ne restaurera que 50% des mutants produits par 5 B U D R. C'est effectivement ce dernier résultat qu'on observe. Il faut noter que ce résultat ne signifie pas qu'une seule chaîne est transcrite en ARN mais seulement que l'information transmise aux protéines est portée par une seule séquence et non par l'ensemble des deux séquences complémentaires.

X - CONCLUSIONS

L'information contenue dans l'ADN est transmise aux protéines par l'intermédiaire de l'ARN messager. Chaque signal pour l'incorporation d'un acide aminé dans une protéine est constitué par un ensemble de 3 bases (ou d'un multiple de 3). Le code n'est pas chevauchant. Il est lu de façon continue sans virgules, à partir d'un point fixe par l'ARN de transfert. L'ARN de transfert se compose de plusieurs espèces moléculaires. Chaque espèce moléculaire est doublement spécifique, d'un acide aminé et d'une séquence de bases de l'ARN messager. Le code est dégénéré en ce sens qu'à un acide aminé correspondent plusieurs ARN de transfert Ces ARNs ne sont pas équivalents car ils sont spécifiques chacun d'un triplet différent, dans la séquence des bases de l'ARN. Une seule des deux chaînes complémentaires de l'ADN contient l'information transmise aux protéines.

.../...

LITTERATURE CITEE

AVERY (O.T.) MAC LEOD (C.M.) et MAC CARTHY (M.) 1944 - Studies on the cheminal nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III-J.Expt.Med.79, 137-138

BEADLE (G.W.) et TATUM (E.L.) 1941 - Genetic contrôl of biochemical reactions in Neurospora. Proc. Natl.Acad.Sci. U.S. 27, 499-506.

BENZER (S.) 1961 - On the topography of the genetic fine structure. Proc. Natl.Acad.Sci.U.S. 47 403-415.

BENZER (S.) et CHAMPE (S.P.)1962, A change from sense to nonsense in the genetic code. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.48,1114-1121

BERG (P.) BERGMANN (F.H.) OFENGARD (E.J.) DIECKMANN (M.) 1961 - The enzymic synthesis of aminoacid derivatives of ribonucleic acid.
I The mechanisin of leucyl valyl isoleucyl and methionyl ribonucleic acid formation. J. Biol.chem. 236, 1726-1734.

BERG (P.) LAGERKVIST (U.) et DIECKMANN (M.) 1962 - The enzymic synthesis of aminoacyl derivatives of ribonucleic acid. VI - Nucleotide sequences adjacent tothe pCpCpA en groups of isoleucine - and leucine- specific chains - Mol.Biol. 5, 159-171.

BRENNER (S) BARNETT (L.)CRICK (FHC) 1961 - The theory of mutagenesis (J. Mol.Biol.3.12. 1-124.

CHAMPE (S.P) BENZER S. 1962 - An active cistron fragment.- J. mol. Biol. 4° 288-292.

CHAMPE (S.P.) BENZER (S.) 1962 bis. Reversed of mutant phenotypes by 5 F U ; an approach to nucleotide sequences in messenger R.N.A. - Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.48,532

CHANTRENNE 1963. Information in biology Nature 197, 27-30

CRICK (F.H.C.) BARNETT (L.) BRENNER (S) WATTS TOBIN (R.J.) 1961 - Général nature of the genetic code for proteins. Nature 192, 1227-1232.

GRUNBERG-MANAGO (M.) ORTIZ (P.J.)et OCHOA (S.) 1956. - Enzymic synthesis of polynucleotides - Biochim.Biophys.Acta 20, 269/

HERSHEY (A.D.) et CHASE (M.) (1952 - Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage.- J. general.Physiol. 36, 39-56.

INGRAM (V) 1958. Abrormal human haemoglobins I the comparison of normal human and sickel cell haemoglobins by "fingerprinting" Biochim.Biophys.Acta 28, 539-545.

JACOB (F. et MONOD (J) 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3, 318-356.

JOSSE (J.) KAISER (A.D.) KORNBERG (A) 1961 - Enzymatic synthesis of D.N.A.. VIII frequences of nearest maghbour base séquences in D.N.A.- J. Biol.Chem. 236, 864-875.

KHYM (J.X.) COHN (W.E.)1961 - Amine induced cleavage of periodate oxydized nucleotide residues. - J. Biol.Chem.236, PC 9

.../...

LAGERKVIST (V) et BERG(P)- 1962 - The enzymic synthesis of aminocicyl derivatives of ribonucleic acid. V. nucleotide sequences adjacent to the pCpCpA endgroups.- J.Mol. Biol. 5, 139-158.

LERMAN (L.S) 1961 - Structural considerations in the interaction of DNA and acridines - J.Mol.Biol. 3, 16-30.

MATTHAEI (J.H.) JONES (O.W) MARTIN (R.G) NIRENBERG (M.W) 1962 Characteristics and composition of RNA coding units. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 48, 666-677

MITCHELL (H.K.) et LEIN (J) 1948 - A neurospora mutant deficient in the enzymatic synthesis of tryptophan. J. Biol.Chem 175, 481-482.

NIRENBERG (N.W.) et MATTHAEI (J.H) 1961 - The dependence of cell free protein synthesis in E.coli upon naturally-occurring or synthetic polyribonucleotides. Proc.Natl. Acad.Sci.U.S. 47, 1589-1602

PREISS (J) DIECKMANN (M.) BERG(P.) 1961. The enzymic synthesis of aminoacyl derivatives of ribonucleic acids. IV The formation of the 3' hydroxyl terminal trinucleotide sequence of aminoacid acceptor ribonucleic acid J. Biol. Chem. 236, 1748-1757.

SPEYER (J.E.) LENGYEL (P) BASILIO (C.) et OCHOA (S) 1962 Synthetic polynucleotides and the aminoacid code IV Proc.Natl. Acad.Sci.U.S. 48, 441-448

SUEOKA (N) 1961. Variation and heterogeneity of base composition of Deoxyribonucleic acids : a compilation of old and newdata. J. Mol.Biol. 3, 31-40.

TSUGITA (A.) 1962 - The proteins of mutant TMV. Composition and structure of chemically evoked mutants of TMV RNA. J. Mol.Biol. 5, 284-292.

TSUGITA (A.) FRAENKEL CONRAT (H.) NIRENBERG (N.W)et MATTHAEI 1962 Demonstration of the messenger role of viral RNA Proc. Natl.Acad.Sci. US 48 p. 846-852

VOLKIN(E.) et ASTRACHAN (L.) 1957. - RNA metabolism in T_2 infected E.coli and the chemical basis of heredity (WD Mc ELROY and B GLASS eds) p.686-694. Johns Hopkins Press Baltimore.

WATSON(J.D.), CRICK (F.H.C.) 1953 a structure for desoxyribose nucleic acids. Nature 171, 737-738.

WITTMANN (H.G.) 1960. Comparaison of the tryptic peptides of chemically induced and spontaneous mutants of tobacco mosaïc virus. Virology 12, 609-612.

WOESE (C.R.) 1962. Nature of the biological code. Nature 194, 1114-1115.

YANOFSKY (C.) HELINSKI (D.R.)MALING (B.D.) 1961. The effects of mutation on the composition and properties of the A protéin of E.coli tryptophan synthetase. Cold spring harbor symposia XXVI 12-24.

MISE AU POINT FEVRIER 1963

ANALYSE D'UN COMPLEXE DE VIRUS SUR CELERI
(Apium graveolens)

D. SPIRE et J. BERTRANDY

Le Celeri est l'hôte de nombreux virus et par là constitue un réservoir non négligeable pour les autres cultures maraîchères.

Le virus de la Mosaïque de la luzerne est considéré comme responsable d'une mosaïque jaune du celeri, plus ou moins accentuée et se portant en général sur le pourtour des feuilles. Des taches en anneaux, des halos jaunes apparaissent souvent au début de l'infection. Ils sont suivis par la mosaïque amenant quelques déformations foliaires. Toutes les souches de la mosaïque de la luzerne n'atteignent pas également le celeri. En effet, VUITTENEZ n'a pas obtenu de symptômes par inoculation expérimentale sur cette plante.

Le virus de la jaunisse des Reine Marguerite (souche californienne) est responsable de la "Porcelaine" ou jaunisse du celeri. Cette maladie se caractérise par une sensibilité particulière à la cassure des feuilles, et par un jaunissement général du limbe.

Le virus de la mosaïque du Concombre est également l'agent d'une mosaïque du Celeri, difficile à distinguer de la mosaïque de la luzerne. Les symptômes produits sont surtout marqués sur les feuilles jeunes. La croissance de la plante est ralentie. Outre ces trois principales maladies, on cite encore comme agents de maladies du Celeri les virus suivants, décelés surtout aux Etats Unis.

Aster ringspot virus
Western Celery mosaïc virus (Apium virus 1 Smith.)
Celery yellow spot
Poison Hemlock ringspot virus (ringspot de la cigüe)
Tobacco broad ringspot et ringspot du tabac
Streak du tabac
Necrose du tabac.

Voici résumé en un tableau les caractéristiques des principaux virus du celeri

Virus	Transmission mécanique	Transmission par insectes	Spécificité surombellifères	Hôte différentiel	Principal symptôme sur Celeri
Mosaïque de la Luzerne	+	aphides non persistant	-	Medicago sativa. Phosedus sativus	Mosaïque
Mosaïque du Concombre	+	aphides non persistant	-	divers chenopodium	Mosaïque
Western Celery Mosaïc	+	aphides persistant	+	Daucuscarota	Mosaïque
Celery Yellow Spot	-	aphides persistant	+	?	tâches chlorotiques
Hemlock poison Ringspot	± impossible à partir du celeri	aphides persistant (24h.	-	Petroselinum crispum	ringspot
Aster Ringspot	+	?	-	capsicum frutescens	ringspot
Ringspot du Tabac (broadringspot)	+	?	-	helianthus annuus	ringspot
Jaunisse des Reine Marguerites	-	cicadelles	-	Vinca Rosea Nicotiana rustica	Jaunisse

ETUDE D'UNE MOSAÏQUE SUR CELERI

Lors d'une série d'indexage afin de contrôler la présence de virus I du concombre sur un celeri fortement mosaïqué de la région parisienne, des symptômes atypiques ont été obtenus lors d'une inoculation au tabac (Nicotiana tabacum var.Samsum).

Les symptômes sur Celeri consistaient en une mosaïque jaune très prononcée de l'ensemble du limbe foliaire, symptômes plus prononcés au centre de la plante que sur la couronne externe où l'on décelait une mosaïque punctiforme et irrégulière.

Lors de l'inoculation au tabac, les symptômes complets se développèrent en 15 jours ; après éclaircissement des nervures, on obtint une mosaïque jaune sans déformation foliaire et une tendance à former des taches en anneaux sur l'ensemble du limbe. Certaines feuilles présentaient un Vein-banding anormal.

Ce tabac servit alors d'inoculum pour une série de plantes. Les principaux résultats furent les suivants :

plante inoculée	Symptômes
Solanum tuberosum	ringspot et necroses le long des nervures. Quelques taches jaunes.
Cucumis sativus	Mosaïque avec déformation légère du limbe.
Vigna sinensis	Lésions locales rouges.
Zinnia elegans	Pas de symptômes.
Phaseolus vulgaris (var.triomphe de Farcy)	Quelques lésions rouges réticulées s'étendant aux nervures adjacentes.
Vicia faba	Taches jaunes au niveau des nervures.
Gomphrena globosa	Pas de symptômes.

cet ensemble de réactions faisant penser à un complexe de virus, nous avons chercher à en séparer les éléments.

Pour éliminer le virus 1 du concombre, la pomme de terre dont les symptômes sont décrits ci-dessus a servi d'inoculum pour une nouvelle série de plantes. Nous avons vérifié l'absence de mosaïque du concombre par indexage sur chenopodium quinoa et chenopodium ficifolium qui ne montraient plus de lésions locales et sur concombre qui ne présentait plus de mosaïque caractéristique..

Par contre, un certain nombre de plantes extériorisèrent encore des symptômes. Les réactions furent les suivantes:/

Sur Nicotiana tabacum (var. Samsum) un éclaircissement des nervures 10 jours après l'inoculation, suivi d'un vein banding.
Sur Nicotiana glutinosa une mosaïque jaune avec un vein banding près du pétiole.
Sur Petunia hybrida (var. velours bleu), une mosaïque très prononcée avec quelques taches jaunes en anneaux.

.../...

Sur Poivron, une légère mosaïque avec quelques plaques jaunes translucides de part et d'autre de la nervure centrale.
Chenopodium quinoa présentait quelques lésions jaunes étoilées au niveau des nervures, lésions très différentes de celles obtenues avec le virus du concombre.
Chenopodium amaranticolor montrait des lésions locales, cerclées de vert foncé puis de rouge.
Phaseolus vulgaris, var. Pinto donnait quelques lésions locales rouge-brun.
Enfin la luzerne (medicago sativa) développait en trois semaines une mosaïque légère, apparente surtout sur les feuilles jeunes.

Photo 1 : En haut à gauche : feuille de Pétunia mosaïquée
En haut à droite : symptôme de ringspot et nécroses nervaires sur pomme de terre
En bas à gauche : Lésions nervaires chlorotiques sur Chenopodium quinoa.
En bas à droite : Vein banding sur tabac.

Les symptômes obtenus sur tabac nous incitèrent à analyser sérologiquement cette plante. Une très nette réaction a été obtenue en présence d'un sérum anti Y avec un extrait de

.../...

Tabac et de Petunia. L'hypothèse d'une souche de virus Y non apparent sur la pomme de terre origine a été éliminée en observant au microscope électronique des particules caractéristiques de Y sur le premier tabac inoculé.

Le Celeri est donc un hôte naturel du virus Y de la pomme de terre.

Un second virus est cependant encore en cause ; l'analyse des symptômes qu'il provoque (mosaïque légère sur luzerne symptômes sur haricot, fève et chenopodium quinoa) fait penser à une souche de mosaïque de la luzerne. L'étude de cette souche est en cours.

La souche du virus 1 du concombre associée sur le celeri aux deux virus précédents a fait l'objet d'une étude. Il s'agit d'une souche peu déformante sur Nicotiana glutinosa et Nicotiana tabacum, et dont une des particularité est de n'occasionner aucun symptôme apparent sur Zinnia elegans et Anthirrinum majus, hôtes habituel du virus.

Le virus provoqué sur concombre et courge les symptômes classiques de Mosaïque.

Sur poivron, il produit une fine marbrure accompagnée d'élongation et de déformation légère des feuilles.

La tomate réagit par une mosaïque simple, sans déformation aucune.

Nous avons comparé cette souche à la souche commune et aucune différence n'a été rencontrée par inoculation mécanique d'une gamme de chenopodes.

- Chenopodium quinoa a présenté de grandes lésions, d'abord chlorotiques puis nécrotiques et bien délimitées, en 5 jours.

- Chenopodium amaranticolor a réagi par des lésions chlorotiques entourées d'un cercle rouge, ces lésions apparaissent du 8ème au 10 ème jour.

- Chenopodium ficifolium a présenté des lésions locales nécrotiques au 8 ème jour ; puis le virus se généralise dans la plante avec mosaïque, et nécrose au sommet.

- Chenopodium ambrosoïdes a réagit par des lésions locales chlorotiques à nécrotiques.

- Chenopodium multifidum produit au bout de 10 jours des lésions locales à bord rouge très délimité .

- Chenopodium foliosum n'a présenté aucune réaction locale, mais une fine mosaïque avec forte déformation des feuilles.

.../...

Ces quatres derniers hôtes, non encore signalés dans la littérature, permettent un test rapide de la présence du virus 1 du concombre sur une plante.

Photo 2 : En haut à gauche : Lésions locales sur chenospodium ficifolium

En haut à droite : Lésions locales sur chenopedium quinoa, chenopodium ambrosoïdes, chenopodium multifidum.

En bas à gauche : Déformation de chenopodium foliosum

En bas à droite : Lésions sur chemopodium amaranticolor

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDERSON(C.W.) 1954 - The aster ringspot virosés of central Florida - Phytopath. 44, 87-92.

DOOLITTLE et WELLMAN 1934 - Commelina nudiflora an host of Celery mosaïc in Florida. Phytopath.24, 48-61

PRICE 1940 - Comparative host range of 6 plant virus. Amer J. Bot. 27, 530-541.

SEVERIN et FREITAG 1938. - Western Celery Mosaïc. Hilgardia 11, 493-538.

SNYDER et RICH 1942 - Mosaïc of Celery caused by the virus of Alfalfa mosaïc. Phytopath. 32, 537-539.

VUITTENEZ et KUSSALA 1961 - Propriétés d'une souche du virus de la mosaïque de la luzerne. Virologie appliquée n° 2, 11-23.

OBSERVATIONS SUR LE COMPORTEMENT DU HARICOT INFECTE PAR LE VIRUS DE LA MOSAIQUE COMMUNE

J.C. DEVERGNE
Station de Pathologie
Végétale - VERSAILLES

Nous avons précisé par ailleurs (BTI 1962 n°169) dans quelles conditions il serait possible de réduire les dégats provoqués sur le haricot cultivé par le virus de la mosaïque commune, en préconisant l'utilisation de semences indemnes de virus et la protection des cultures dans les premiers stades de la végétation. Quelques observations faites en 1962 sur des plantes infectées en serre ou au champ, apportent une confirmation à ces suggestions.

I - TAUX DE TRANSMISSION PAR LA SEMENCE ET EXTERIORISATION PRIMAIRE DES SYMPTOMES.

Une épuration précoce des sujets malades en champ, n'est pratiquement réalisable que dans la mesure où le taux de transmission du virus par la graine, reste faible et l'extériorisation des symptômes, rapide et fidèle.

Le dénombrage des plantes issues de graines infectées a été déterminé, en serre, pour quelques lots de semence du commerce, appartenant à trois variétés sensibles : Princesse, Triomphe de Farcy et Fin de Bagnols.

On a observé que :

a) Certaines plantes montrent une marbrure très nette sur les feuilles primaires (feuilles cotylédonaires) accompagnée ou non de déformations (Stade "O").
b) Les mêmes plantes extériorisent sur la première feuille trifoliolée (Stade I), une forte mosaïque déformante avec enroulement, filiformisme ou cloques, caractéristiques de l'infection par le virus de la mosaïque commune.
c) aucune autre plante, non décelée au stade "O" né s'est montrée virosée par la suite.
d) Le taux de transmission par graine, ainsi déterminé, varie entre 2 et 7 % seulement.

D'autre part, le pourcentage de plantes malades à partir de la graine, était inférieur, dans le cas de deux lots de haricots cultivés en champ, à 1,3% et 5,1% (voir paragraphe II)

.../...

Ces indications montrent donc que la contamination de la graine est souvent plus faible qu'on pouvait le penser et que le tri des plantes, dès le stade "O" est souvent possible.

II - COMPORTEMENT AU CHAMP

Deux parcelles de comportement, l'une de haricots variété Fin de Bagnols, l'autre de haricots variété Triomphe de Farcy, ont été semées en été 1962 (lots de semences du commerce). On a évité la proximité immédiate d'une autre culture de haricots; de plus les deux parcelles étaient bordées du côté nord par un rang de fève (var.Seville à longue cosse). Chaque semaine, cette bordure de fèves a été traitée avec un insecticide classique (phosdrin); les deux parcelles de haricots ont également reçu deux traitements au début de la végétation.

Observations

a) Au stade "O" (deux feuilles cotyledonaires complètement développées) toutes les plantes présentant des symptômes de viroses ont été éliminées, ainsi que les plantes chétives ou mal levées ; ces dernières en effet peuvent être contaminées sans qu'il soit possible de le savoir par la simple observation visuelle.

Cette épuration a permis de chiffrer (par excès) l'importance de la transmission par la graine, décelable à ce stade et de réduire au maximum les dangers de contamination à partir de ces foyers primaires intérieurs à la culture.

Cette épuration a porté sur les chiffres suivants :

Epuration au Stade "O"	Fin de Bagnols	Triomphe de Farcy
Nombre de plantes épurées	10	26
Pourcentage	1,3%	5,1%

b) Aucune épuration n'a été faite par la suite, en cours de végétation. Les plantes montrant des symptômes ont été dénombrées respectivement aux stades I (une feuille trifoliolée entièrement développée), II (deux feuilles développées) et après la floraison. Ces plantes ont été considérées comme des infections secondaires. N'ayant pas été éliminées, elles ont permis de déterminer la progression de l'infection à partir des premiers sujets contaminés.

...../....

	Fin de Bagnols		Trimmphe de Farcy	
	Nombre	%	Nombre	%
Stade I	10	1,3%	8	1,7%
Stade II	-	-	16	3,4%
après floraison	60	8	69	I4,2%
% calculé sur le nombre de plantes subsistant après l'épuration au stade "O"				

Ce tableau montre que le nombre de plantes virosées avait doublé pour la variété Triomphe de Farcy entre les stades I et II. Après floraison, il était multiplié par 6 pour la variété Fin de Bagnols et par 8 pour la variété Triomphe de Farcy.

L'emplacement des plantes malades a été figuré sur la planche ci-contre (voir la légende). Cette représentation de l'état sanitaire desparcelles aux différents stades de la végétation permet de faire les hypothèses suivantes :

1) Alors que la localisation des plantes infectées par la graine et épurées au stade "O", est le fait du hasard à l'intérieur des parcelles, les sujets infectés au stade I se groupent essentiellement dans la partie sud du champ, ce qui suggère une infection secondaire venant de la direction Sud-Est (vraisemblablement par pucerons).

2) L'infection progresse ensuite très nettement par foyers au voisinage des premières plantes infectées au stade "I".

3) L'épuration des plantes au stade "O" parait valable puisque le nombre de plantes malades à la floraison reste faible dans la partie nord des parcelles.

4) Les parcelles ayant été traitées contre les invasions de pucerons et épurées seulement au stade "O", comme il a été indiqué ci-dessus, il n'a pas été possible d'éliminer toutes les infections.

Les pertes se soldent en tenant compte des plantes épurées et des plantes malades, par 9,2% des plantes pour la variété"Fin de Bagnols" et par 18% pour la variété "Triomphe de Farcy".

5) Incidence de la bordure des fèves. - On peut penser que la bordure des fèves au Nord des parcelles a joué un rôle de protection. Il n'est cependant pas possible de l'affirmer en raison de l'orientation probable des vols de pucerons.

Mais on pouvait craindre au contraire que ces fèves servent indirectement de foyers de reproduction pour les colonies d'aphides. Le résultat de l'essai montre bien qu'il n'en a rien

.../...

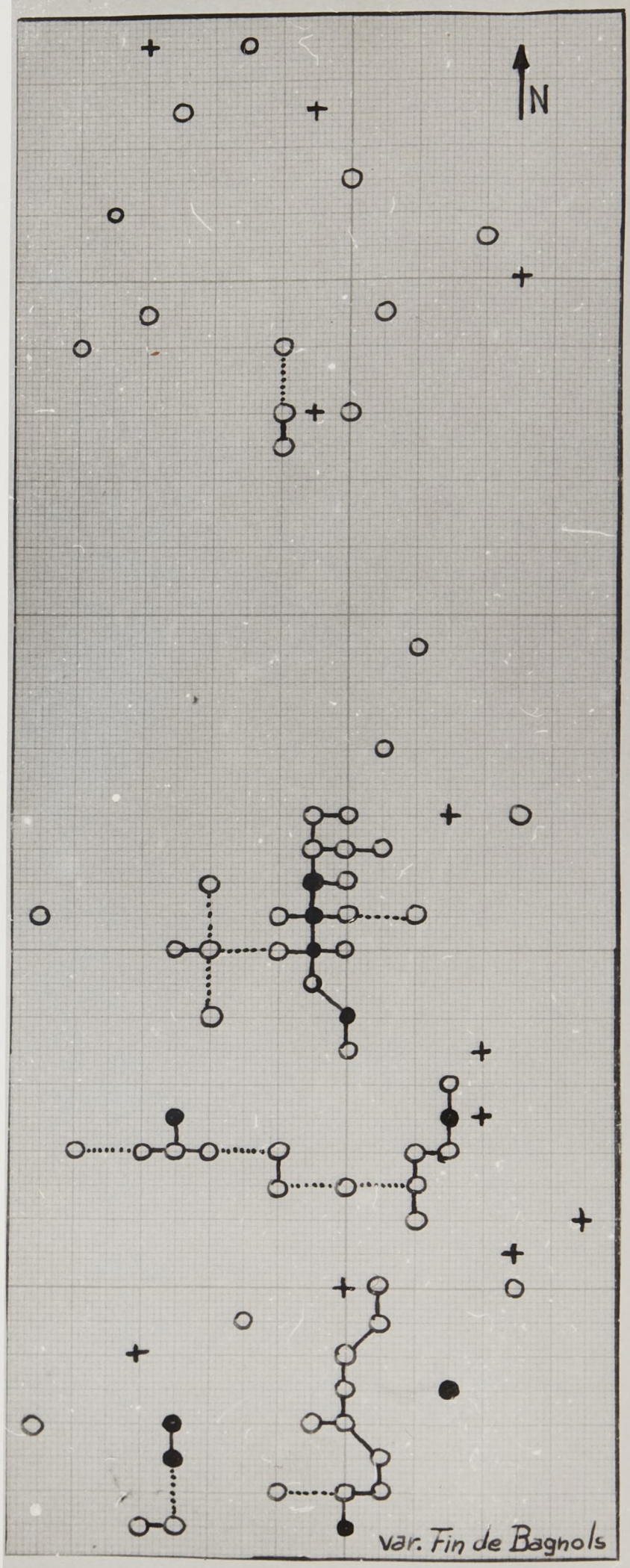
été, dans les conditions de traitements indiquées.

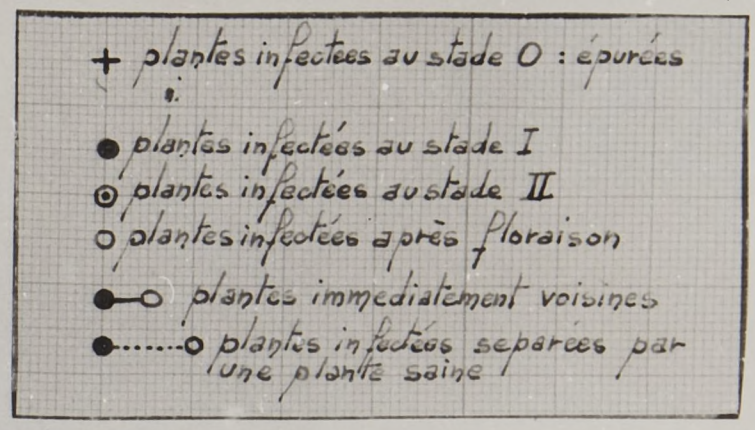
III - CONCLUSIONS

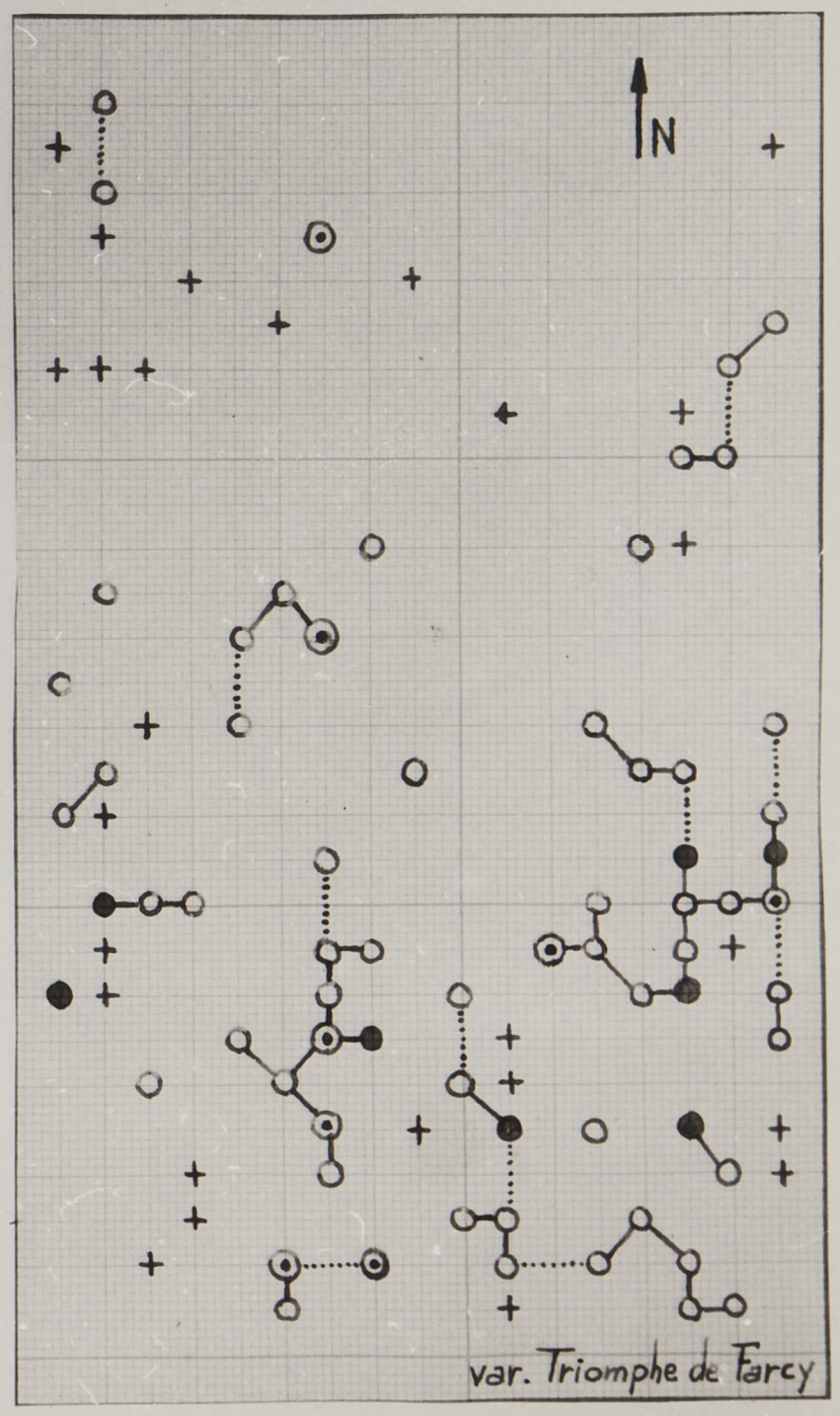
Cet essai de comportement, effectué dans des conditions normales de culture apporte des éléments intéressants pour la sélection sanitaire du haricot. Il confirme l'importance indéniable des foyers primaires intérieurs au champ, à partir desquels se font très rapidement les contaminations secondaires ; il montre également qu'il est souvent possible d'opérer une épuration précoce valable; lorsqu'une deuxième épuration un peu plus tardive est pratiquement réalisable, on peut penser que celle-ci aura une incidence très favorable sur la réduction des plantes infectées secondairement.

Enfin, il représente le point de départ d'essais ultérieurs qui devraient montrer l'influence d'une protection efficace contre les invasions de pucerons, par bordure protectrice.

Des essais seront réalisés en 1963 pour préciser certains de ces aspects.







REPRESENTATION DE L'ETAT SANITAIRE DE DEUX PARCELLES DE HARICOTS, AU COURS DE LA VEGETATION (INFECTIONS PAR LE VIRUS DE LA MOSAÏQUE COMMUNE)

ETUDE COMPAREE DE DEUX VIRUS DU TABAC

POUVANT INFECTER LE HARICOT

J.C. DEVERGNE
Station Centrale de Pathologie
Végétale - VERSAILLES

Travail réalisé avec la collaboration de Mr SMITH

Les virus du "streak du tabac" et de la "necrose du Tabac" sont connus depuis fort longtemps : le streak a été décrit aux Etats Unis, dans le Wisconsin dès 1936 par JOHNSON, la nécrose en 1935 par SMITH et BALD ; ce dernier virus fut obtenu a l'état cristallisé par PRICE en 1938.

Les deux virus ont été respectivement appelés Nicotiana virus 8 et Nicotiana virus 11 (SMITH) ou encore, selon la nomenclature latine binominale de HOLMES, Annulus orae (STREAK) et Marmor lethale (nécrose)

Leur spectre d'hôtes est très large (169 espèces pour le virus du streak selon JOHNSON) cependant le nombre des espèces infectées dans les conditions naturelles est plus restreint. Pour les deux virus, l'infection se traduit par des symptômes nécrotiques souvent voisins ; de plus la réaction systémique de la plante infectée (lorsqu'elle se manifeste) est fréquemment fugace, avec phénomène de "recovery". L'apparition et la disparition de ces symptômes, leur intensité, leur aspect même sont des plus capricieux, ce qui rend leur étude assez délicate. Pour ces virus tout particulièrement, il semble que les conditions de milieu (température, durée d'éclairement, humidité) aient une très grande importance dans la généralisation et l'extériorisation de l'infection.

Les maladies provoquées par les virus du streak et de la nécrose, se transmettent par le sol, le virus est présent dans les racines du végétal virosé et dans le cas de la nécrose notamment il s'y localise. Ceci explique que les infections naturelles se manifestent le plus souvent par foyers assez limités. D'ailleurs, on ne leur connait pas d'insecte vecteur. On a remarqué cependant que, dans certaines infections du haricot par le virus du streak, la distribution des plantes malades dans le champ suggère parfois une dissémination par agents ailés.

Parmi les hôtes sensibles à ces deux virus, il est intéressant de mentionner le haricot cultivé (Phaseolus vulgaris L) à partir duquel ont pu être isolées deux souches particulières de ces virus :

1) en Hollande, un virus de la nécrose du tabac est responsable d'une nécrose systémique du haricot, appelée "Stipple streak"; la maladie a été étudiée en 1948 par VAN DER WANT, cette réaction généralisée permet d'ailleurs de différencier cette souche du virus type de la nécrose qui ne donne que des lésions locales sur le haricot.

.../...

2) D'autre part, un virus du streak du tabac a été observé sur le haricot au Colorado ; la souche, isolée en 1950 par THOMAS & ZAUMEYER, fut dénommé par les auteurs Annulus orae var. phaseoli. La maladie est connue sous le nom de "Red Node" Cet isolement diffère du virus type de streak, par le fait qu'il n'infecte pas Nicotiana glutinosa.

Au cours des travaux poursuivis à VERSAILLES, nous avions noté l'existence d'un virus du streak, en provenance de légumineuses naturellement infectées, pois et trèfles (Virologie appliquée 1960 p. 63). Bien qu'il puisse infecter Nicotiana glutinosa, ce virus montrait quelque analogie avec la souche Red Node, à laquelle nous l'avions comparée (Ann. Epyphyties 1961, p. 219-236)

En 1962, des manifestations nécrotiques observées à plusieurs reprises, en serre, sur haricot Princesse, ont donné lieu à une étude en vue de déterminer l'agent responsable de cette maladie. Les symptômes observés se traduisaient par des nécroses brun rougeâtre sur la tige, les pétioles et les nervures principales des feuilles ; il y avait également quelques nécroses foliaires ; enfin, les gousses, fortement déformées présentaient des taches déprimées circulaires, parfois zonées, nécrotiques et rougeâtres. Les plus jeunes gousses ne contenaient pas de graines. Fréquemment la plante se nécrosait totalement.

L'isolement de l'agent responsable a conduit à un virus du type nécrose du tabac, qui, par sa propreté d'infecter systémiquement le haricot, pouvait se ranger à côté du stipple streak hollandais.

Toutefois, nous n'avons pas observé de tels symptômes en champ .

Devant la similitude des manifestations nécrotiques sur haricot, occasionnées par ces deux virus du steak et de la nécrose, nous avons été amenés à étudier comparativement ces deux souches en précisant les symptômes obtenus, dans des conditions rigoureusement analogues pour les deux virus, sur un certain nombre d'hôtes sensibles utilisés fréquemment en virologie.

Toutes les inoculations ont été réalisées sur le mode mécanique, par frottement des feuilles préalablement soupoudrées de carborundum. Les plantes inoculées avec la nécrose, ont été rassemblées dans un local séparé et les pots placés dans des bacs en matière plastique, afin d'éviter toute contamination accidentelle.

Les résultats de ces inoculations sont groupés dans les deux tableaux suivants et les principaux symptômes reproduits sur les planches I (nécrose) et II (streak).

.../...

On peut y remarquer que :

1) L'infection par le virus de la nécrose du tabac se traduit le plus souvent par des symptômes locaux sur les feuilles inoculées, sans généralisation àpparente.

Seuls, le haricot et quelquefois le tabac sont infectés systémiquement.

Au contraire, le virus du streak est systémique sur le Nicotiana glutinosa, le tabac (quelquefois fugaces), Solanum villosum, le piment, le haricot, le concombre.

2) L'aspect des réactions locales obtenues permet également de différencier les deux virus :

Sur le Chenopodium quinoa, en particulier, les nécroses étoilées sont très caractéristiques du virus de la nécrose, celles du streak étant beaucoup plus arrondies. On remarquera cependant que l'âge de la feuille inoculée peut avoir une influence sur l'aspect de ces lésions et qu'il convient d'utiliser les feuilles des étages moyens de la plante (entre la 4è et la 8è feuille).

Sur le tabac et le haricot, les symptômes locaux sont beaucoup plus graves avec le virus de la nécrose qu'avec le virus du streak. Les feuilles inoculées avec la nécrose flétrissent. Les manifestations du streak sur la feuille de tabac inoculée sont au contraire assez bénignes et ne portent pas préjudice à la feuille.

3) Le virus de la nécrose est le seul à donner des lésions locales sur pois de senteur (lésions très petites à peine visibles), le pétunia, le concombre et gompheno globosa.

4) Enfin on notera que des extraits particulièrement riches en virus ont pu être réalisés à partir de feuilles inoculées par le virus de la nécrose chez le Gomphrena et le haricot (var. top crop); les racines de haricot sont également riches en virus.

Pour le streak, le Nicotiana glutinosa est une source intéressante.

Les inoculations à partir de jus de Chenopodium amaranticolor, n'ont donné des résultats que sur les Chenopodes et non sur les autres plantes, ceci pour les deux virus.

En conséquence, l'identification des virus du streak et la nécrose, à partir de haricots infectés, peut-être grandement facilitée par l'utilisation des hôtes mentionnés ci-dessus.

ADDITIF BIBLIOGRAPHIQUE

Quelques autres hôtes différentiels ont été recommandés par les auteurs :

Le virus de la nécrose donne des lésions locales chlorotiques sur Tetragonia ; la tulipe, la laitue et la primevère sont des hôtes naturels du virus..

De son côté, le virus du streak du tabac donne des lésions locales brunes sur Cyamopsis tetragonoloba, il provoque également une déformation très caractéristique des feuilles d'Arctium(FULTON I948).

VIRUS DE LA NECROSE DU TABAC

(planche photos I)

HOTES	Réaction locale sur feuille inoculée	Réaction systémique
Solanées Nicotiana tabacum,L	tâches nécrotiques irrégulières, devenant confluentes, flétrissement (photo A)	O ou : nécrose des nervures et de la tige, zônes brunes déprimées nécrose apicale (photos C & D)
Nicotiana debneyi,L	tâches nécrotiques arrondies cerclées de brun foncé (photo B)	?
Solanum villosum, L	chlorose et nécrose diffuse	O
Capsicum	O	O
Petunia hybrida,Vilm	petites lésions nécrotiques arrondies cerclées de brun (photo K)	O
Legumineuses Phaseolus vulgaris,L	forte nécrose des nervures.Plages nécrotiques confluentes flétrissement (photos E et F)	nécrose apicale nécroses rouges sur les nervures,taches en ringspot sur gousses.
Lathyrus adoratus,L	petites nécroses brun clair (photo I)	O
Vigna sinensis(L) Endl	Nombreuses lésions nécrotiques, flétrissement(photo G)	O
Cucurbitacées Cucumis sativus,L	taches chlorotiques à centre nécrotique brun (photo H)	O
Chenopodiacées Chenopodium amaranticolor COSTE &REYNE	Lésions nécrotiques arrondies quelquefois étoilées avec halo chlorotique(photo L)	O
Chenopodium quinoa, Willd	Lésions arrondies ou étoilées avec halo chlorotique(photo M)	O
Amarantacées Gomphrena globosa,L	Lésions brunes cerclées confluentes (Photo J)	O

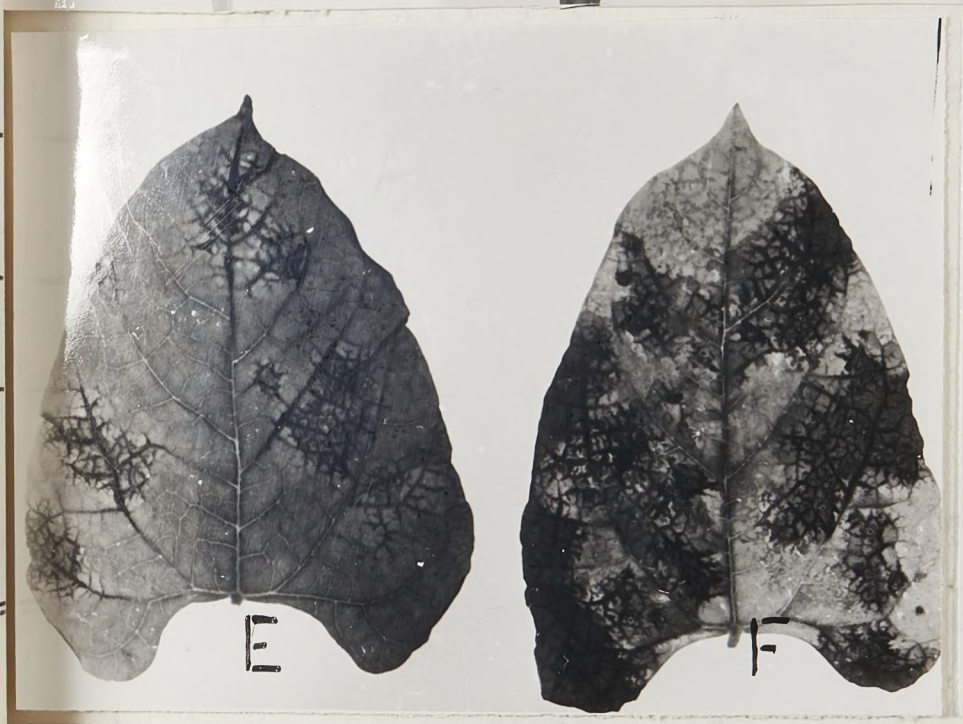


PLANCHE I - VIRUS DE LA NECROSE DU TABAC

VIRUS DU STREAK DU TABAC

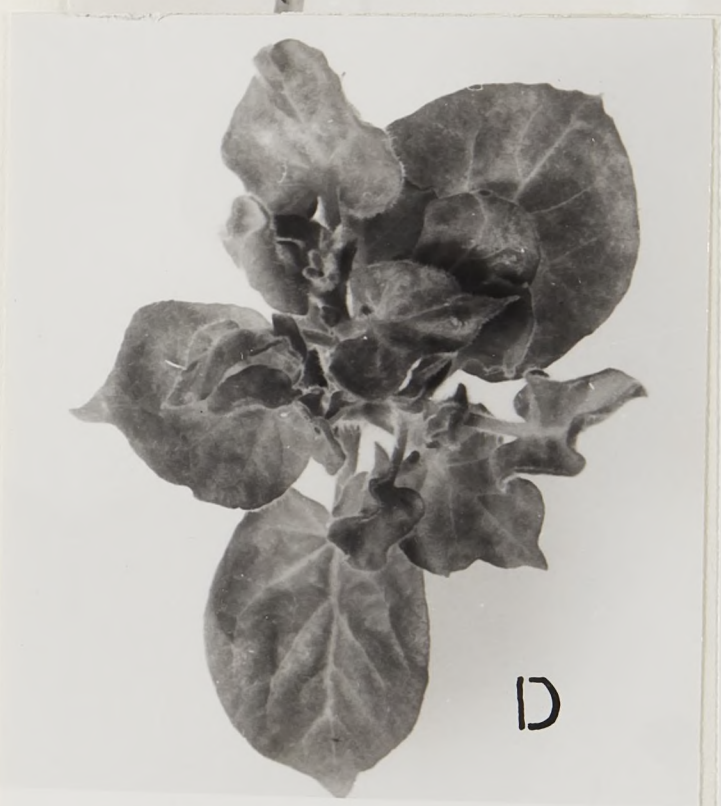
(Planche photo II)

HOTES	Réaction locale sur feuille inoculée .	Réaction systémique
Solanées		
Nicotinia tabacum,L	petites taches nécrotiques blanchâtres disposées en cercles concentriques. (Photo A)	taches nécrotiques blanchâtres en lignes parallèles au nervures taches chlorotiques dessins en feuille de chêne "recovery" (photos B & C)
Nicotiana glutinosa, L	chlorose-Ringspot tardif	forte mosaïque déformante,aspect brillant du feuillage,rosette terminale(photo D)
Solanum villosum,L	taches chlorotiques	nécroses bruns à la base de la feuille.nécrose des nervures;déformation des feuilles (photos E & F)
Capsicum frutescens, L	nécroses brunes sorrégulières	nécrose et chlorose. légère déformation des feuilles (photo J)
Petunia hybrida,vilm	0	0
Légumineuses		
Phaseolus vulgaris,L	nécroses rouges des nervures.Quelques larges taches nécrotiques	nécrose apicale. Déformation des feuilles nécroses sur gousses
Lathyrus adoratus,L	0	nécrose systémique
Cucurbitacées		
Cucumis sativus, L	chlorosé	taches chlorotiques (photo G)
Chenopodiacées		
Chenopodium amaranticolor COSTE & REYN	très rares lésions rouges s'élargissant	0
Chenopodium quinoa Willd	petites lésions brunes circulaires avec halo chlorotique(Ø 1-2mm) (photo H)	0 ou : tendance à une chlorose systémique ? (photo I)
Amarantacées.		
Gomphrena globosa,L	nécroses rougeâtres irrégulières diffuses	0

A

B

C


D

E

F

G

H

I

J

PLANCHE II - VIRUS DU STREAK DU TABAC

ETUDE MICROSCOPIQUE ET SEROLOGIQUE D'UNE FRACTION INFECTIEUSE ISOLEE DE FEVE

J.C. DEVERGNE
Station de Pathologie
Végétale - VERSAILLES

- Travail réalisé avec la collaboration de Mr SMITH.

La fève (Vicia faba, L) est une plante hôte pour la plupart des virus de légumineuses (voir "Virologie appliquée 1960); De plus, sa croissance rapide en serre, en fait une plante de choix pour le virologiste désirant disposer pendant toute l'année de quantités relativement importantes de suspensions virales.

Dans le but de multiplier une souche présente chez le glaieul et présumée être le virus de la mosaïque jaune du haricot (Phaseolus virus 2), nous avons réalisé des transmissions mécaniques de glaieul à fève, puis de fève à fève (variété : Seville à longue cosse). Les symptômes observés sur cette plante, apparaissent environ 14 jours après l'inoculation, sur les plus jeunes feuilles, comme des taches chlorotiques diffuses puis arrondies ("chlorotic spotting"); par la suite, se développe une forte mosaïque avec des plages jaune vif, principalement localisées au voisinage des nervures. Les pousses axillaires de la plante infectée sont gravement mosaïquées, rabougries et déformées.

I - EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'AGENT INFECTIEUX

Les feuilles mosaïquées, récoltées sur des plantes infectées depuis trois semaines environ, sont broyées au mortier dans une solution de SO_3Na_2 - 0,01M; ce milieu d'extraction a été utilisé par BANCROFT & KAESBERG (1959) pour l'isolement du virus de la mosaïque jaune du haricot. Le broyage, ainsi que les centrifugations suivantes sont faits à 4° C. (L'utilisation d'un broyeur à hélice provoque une oxydation rapide du jus de fève et il est préférable de broyer les feuilles au mortier).

La suspension brute, filtrée sur étamine est clarifiée à 10.000 g.

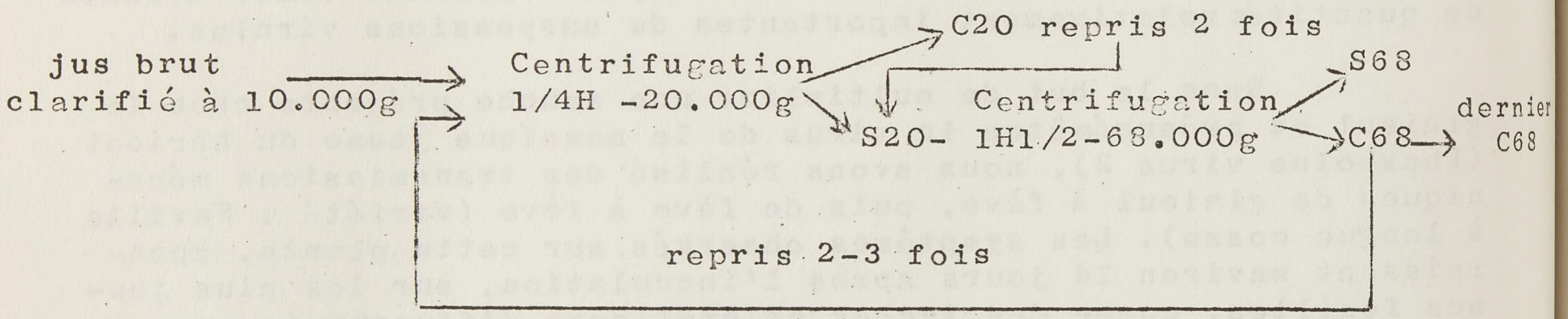
Des examens antérieurs nous avaient montré que les virus du type batonnets(mosaïques du pois et du haricot) étaient très facilement entraînés au cours des centrifigations, même à faible vitesse (soit par adsorption des particules sur le gros matériel cellulaire, soit par aggrégation du virus au cours de la purification).

.../...

Afin de réduire ces pertes au maximum, tous les culots de centrifugation sont ici repris dans la solution extractive , homogénéisés dans un homogénéiseur Potter et centrifugés à nouveau. Les processus peut être répété 2 ou 3 fois.

Le jus brut clarifié, enrichi des surnageants successifs des centrifugations à 10.000 g, est alors centrifugé dans une ultracentrifugeuse Spinco à 15000 tours/minute (Rotor 30) pendant 1/4 heure, soit 20.000g. Après reprise des culots C20, homogénéisation et centrifugations successives à 20.000g, les surnageants sont ensuite centrifugés 1 heure et demie à 28.000 tours/minute (Rotor 30) soit 68.000g. Les derniers culots C68 sont repris dans la solution extractive et le cycle d'ultracentrifugation, faisant alterner les sédimentations à 20.000 et 68.000 g, est répété 2 ou 3 fois.

Le schéma de purification est le suivant :



II - EXAMENS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Les examens microscopiques (microscope RCA EMU 3B) ont été réalisés sur des particules traitées selon la technique de coloration négative à l'acide phosphotungstique neutralisé (BREENER & HORNE 1959) (membrane support de carbone ; grandissement directs des clichés, de 20.000 à 60.000 fois).

L'observation des culots C68 obtenus dès le premier cycle, a montré l'existence de deux types de particules :

a) - des éléments allongés, en bâtonnets flexueux de 11-12 mμ de diamètre. Ces particules correspondent au virus de la mosaïque jaune du haricot tel qu'il a été décrit par plusieurs auteurs et tel que nous l'avons observé dans des extraits de diverses plantes virosées.

b) - des éléments parasphériques très nombreux, d'un diamètre moyen de 18 mμ

La présence insoupçonnée de ce second type de particules est particulièrement intéressante.

Lorsqu'on poursuit la purification par 2 ou 3 cycles identiques au premier, on concentre les éléments parasphériques au détriment des particules en bâtonnets. Ces dernières semblent progressivement éliminées par les centri-

.../...

fugations successives Le dernier culot C68, après 3 cycles, fournit une suspension très riche en particules rondes, comme le montre le cliché (vue d'ensemble; grandissement X 100.000). Dans les suspensions concentrées, les particules s'arrangent en figures géométriques très régulières, suggérant des cristaux. Enfin, on note parfois l'existence de quelques particules cependant rares, dont le centre reste sombre et qui rappellent les particules "creuses" reconnues pour certains virus "ronds", comme le virus de la jaunisse du navet, par exemple, et considérées comme des éléments dépourvus d'acide nucléique ("top component") (voir cliché de détail).

III - ETUDE SEROLOGIQUE

La fraction C68 purifiée, riche en particules homogènes, a été injectée à un lapin, en vue de l'obtention d'un sérum "anti-C68". Après 4 injections intramusculaires, à 8 jours d'intervalle chacune, à raison de 1 cm3 d'extrait C68 additionné de 1 cm3 d'adjuvant complet de Freund, l'animal est sacrifié et le sérum recueilli, testé en plaques de gélose à 1% contenant 9g‰ de chlorure de sodium (méthode d'Outcherlony).

Quelques réactions sérologiques obtenues sont représentées sur la planche jointe.

1) Plaque "O"

Les premiers stades de la purification telle qu'elle a été décrite ci-dessus, ont été représentés sur la plaque O et chaque fraction testée sérologiquement (+ sérum brut) pour déceler la présence de particules.

On remarque une ligne de précipitation avec le jus brut, le premier surnageant S20, le culot C68 (très forte réaction) et le même culot clarifié à 20.000g (S20). Le culot C20 de cette même centrifugation contient encore des particules.

On peut en déduire que la première centrifugation à 20.000g n'entraîne pas de particules; celles-ci sédimentent entièrement à 68.000g (pas de réaction avec le S68). Par contre, la clarification à 20.000g du culot C68 reprécipite une fraction de ces éléments; il convient donc à ce moment de reprendre ce culot et par des homogénéisations successives de récupérer le maximum de particules.

2) Plaque A B & C

Ces trois plaques représentent les réactions obtenues respectivement avec la fraction C68, avec un jus brut de feuilles et avec un jus brut de racines; la ligne supérieure correspond à des fèves saines (S) l'inférieure à des fèves malades (M). Des dilutions du sérum allant du sérum brut au sérum dilué au 1/256è ont été placées dans les trous centraux.

D'une manière générale, le sérum ne réagit pas avec les extraits issus de plantes saines; on décèle seulement une

.../...

faible ligne de précipitation avec le sérum brut et le jus de feuilles de fèves saines, situé à mi-chemin entre les deux trous contenant antigène et anticorp.

Une nette précipitation est visible par contre avec les jus malades, très proche du trou contenant l'antigène, avec des dilutions décroissantes du sérum allant jusqu'au 1/64è pour la fraction C68, 1/128è pour l'extrait de feuilles et jusqu'au 1/32è pour l'extrait de racines.

Le sérum permet donc, sans ambiguité, de déceler le virus dans les extraits ; le virus est présent dans les racines de fèves infectées.

3) - Plaque D

Afin de vérifier le pouvoir infectieux des particules parasphériques caractéristiques de la fraction C68 purifiée, des inoculations mécaniques ont été réalisées avec cette fraction, ou avec un jus brut de fèves, sur quelques légumineuses et sur le pétunia.

Une réaction symptomatologique très nette a été obtenue, 8 jours après l'inoculation sur feuilles cotylédonaires de haricot variété Pinto ; les feuilles se chlorosent en laissant subsister des taches vertes arrondies; il y a ensuite flétrissement.

Les symptômes sur les autres plantes étaient diffus.

La plaque D, montre les réactions sérologiques obtenues avec différents jus brut de plantes inoculées (+ serum brut)

Une précipitation en V, proche du trou contenant l'antigène est visible pour

- le jus brut de fève infectée (FM)
- la fraction C68 purifiée (FM.C68)
- le jus de feuilles cotylédonaires de haricots infectés(HC)
- deux extraits de trèfle incarnat (TI)
- ? le jus de pétunia (P)

De plus une ligne beaucoup moins marquée, située à mi-chemin entre les trous contenant l'antigène et le sérum peut être décelée avec les extraits de luzerne lupuline (LL) et de trèfle blanc (TR)

Une ligne analogue est obtenue avec les extraits de fèves malades (FM) et saines (FS). Elle correspondrait dans ce cas à une réaction protéine normale.

CONCLUSION

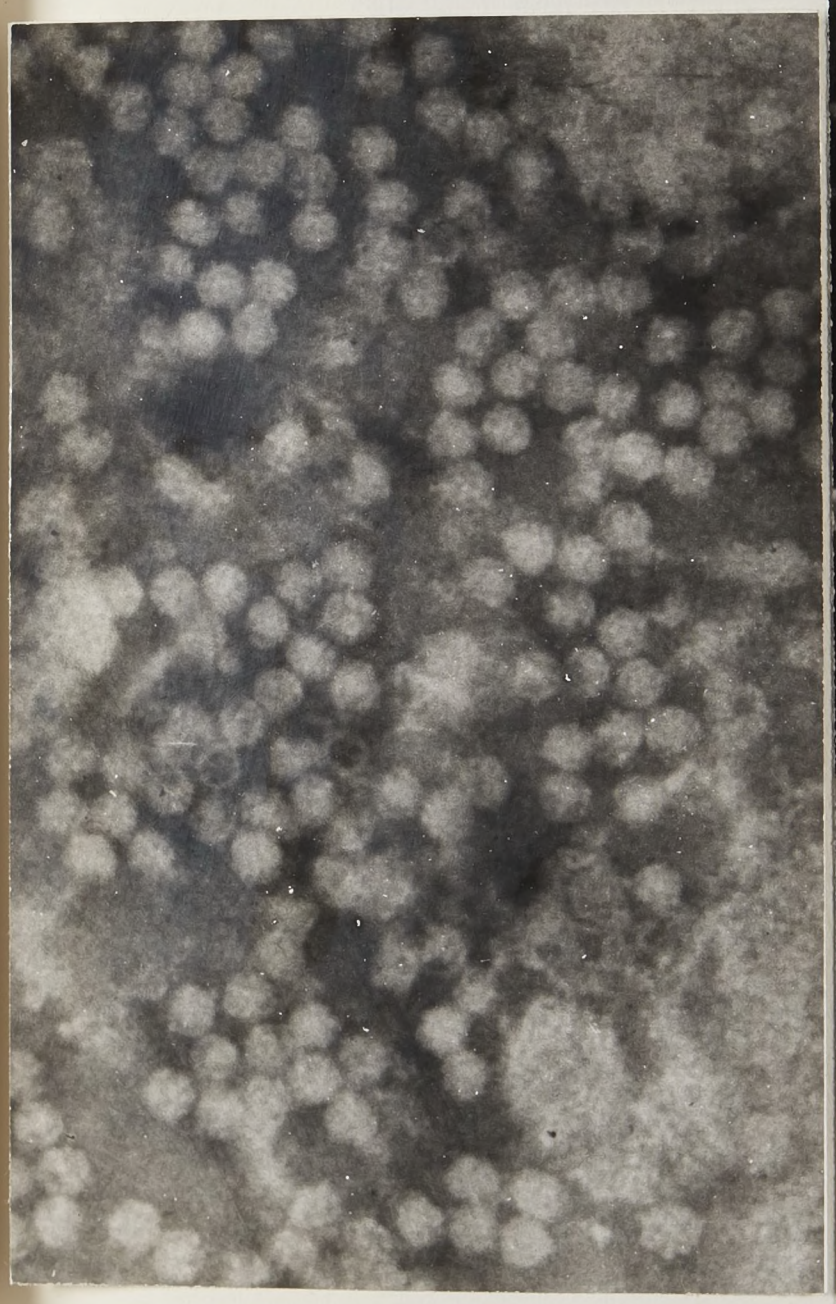
Ce travail constitue l'étude préliminaire d'une fraction de fève infectée obtenue par centrifugation différentielle.

Il s'agit de particules parasphériques de 18 mμ de diamètre moyen qui sédimentent à 68.000g (centrifugation de 1 heure et demie).

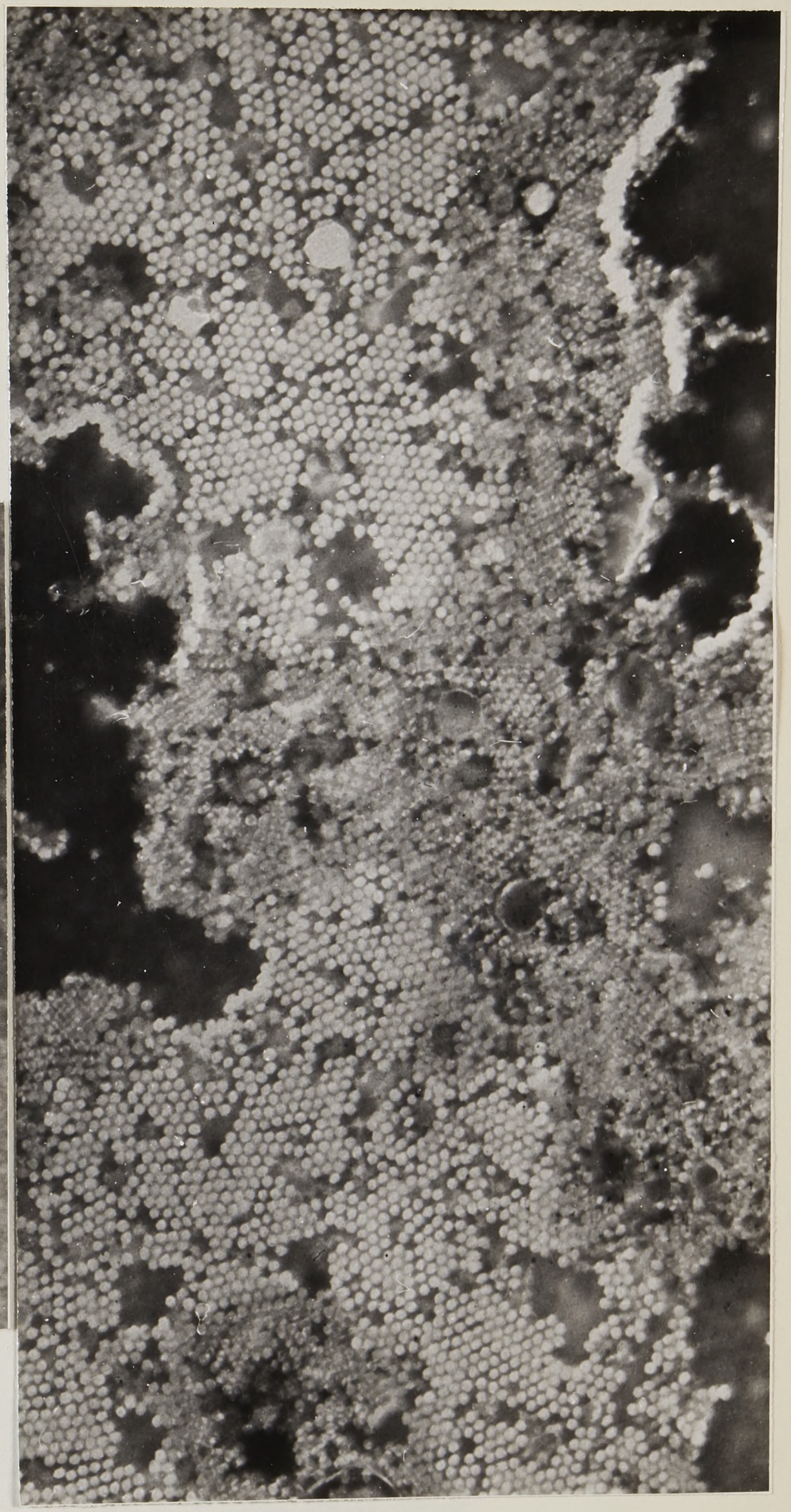
Ces particules possèdent un fort pouvoir antigénique reconnu par les réactions obtenues avec le sérum préparé, avec cette fraction.

Ces éléments, enfin, qui existent dans les parties aériennes et dans les racines de la fève, sont infectieux pour quelques autres légumineuses dont le haricot.

Il s'agit donc d'un virus que nous nous proposons d'étudier,

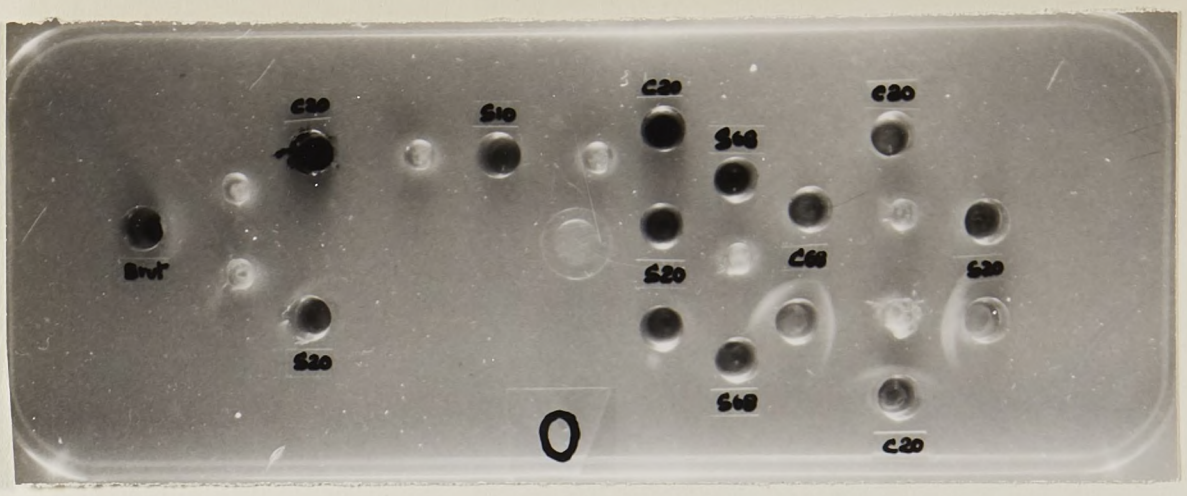


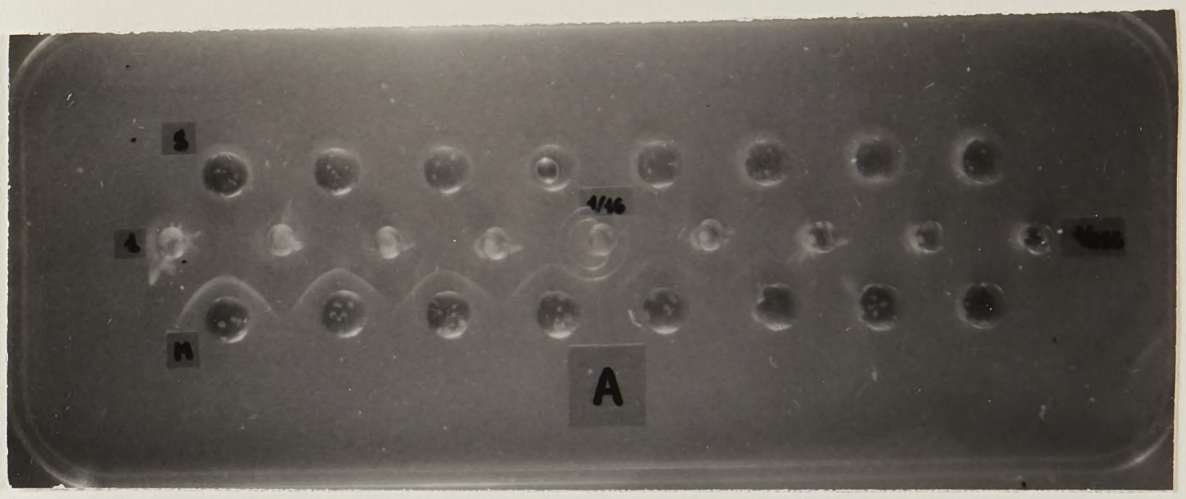
détails X 250.000

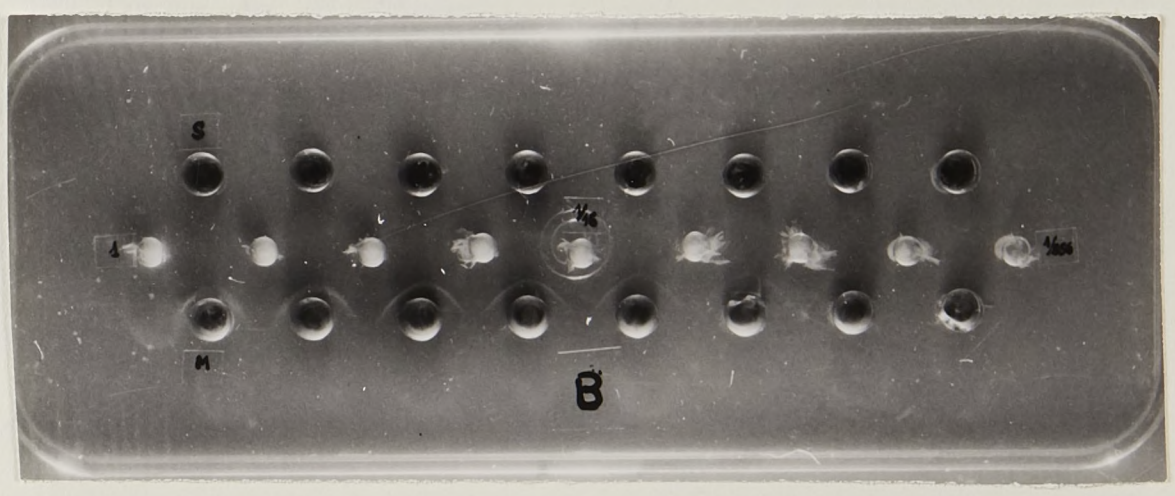


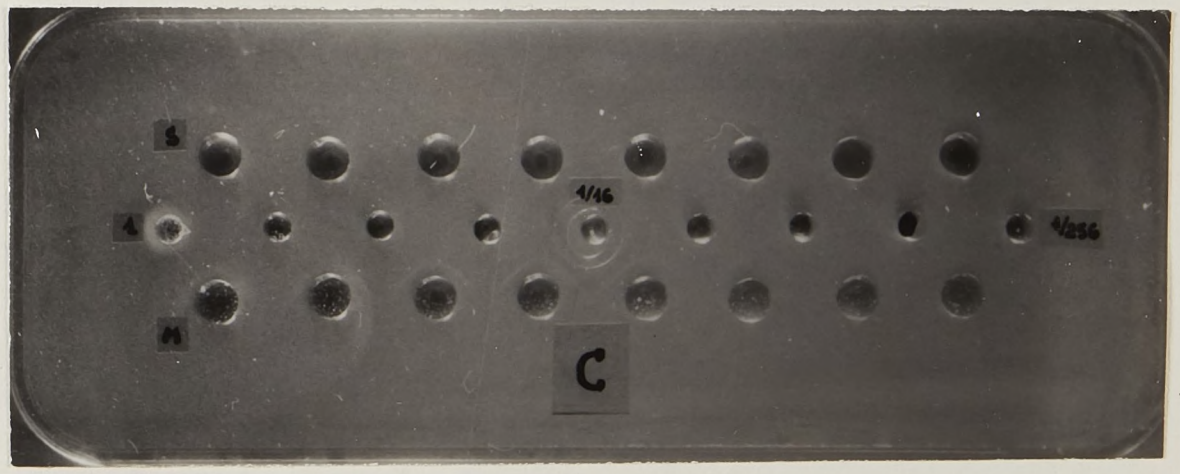
X 100.000

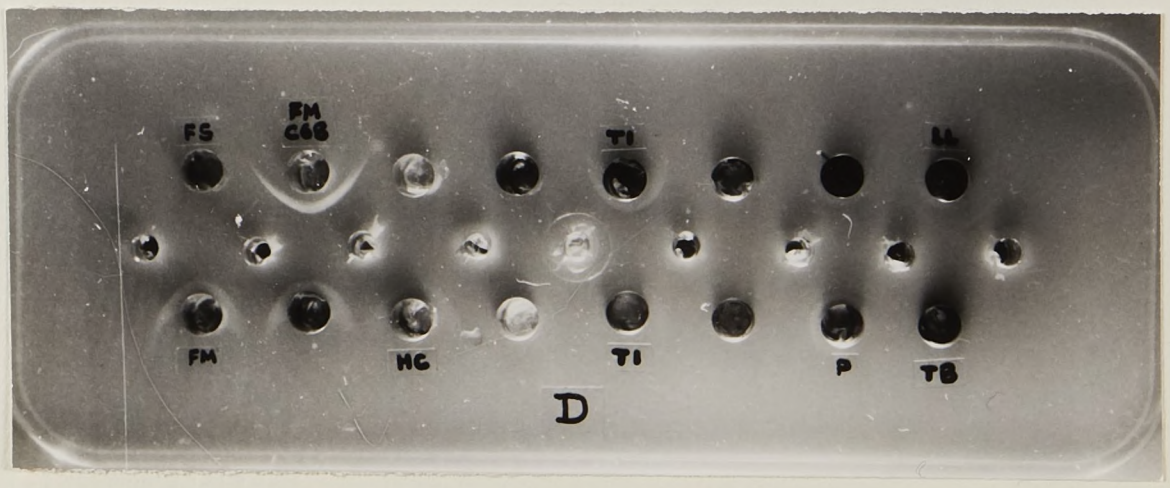
ASPECT AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DE LA FRACTION C68











REACTIONS SEROLOGIQUES AVEC LE SERUM ANTI - C68
(Voir légende dans le texte)

ISOLEMENT, PROPRIETES PHYSIQUES ET SEROLOGIQUES DU VIRUS DE LA DEGENERESCENCE INFECTIEUSE CHEZ LES CHENOPODES ET LA VIGNE

A. VUITTENEZ

collaboration technique J. KUSZALA

La transmission mécanique de virus à plantes herbacées à partir de vignes atteintes de différentes formes de la dégénérescence infectieuse (feuilles en palmettes, mosaïque ou panachure) a été obtenue pour la première fois par CADMAN et al. (comm. pers. octobre 1959).

Ce résultat est confirmé maintenant par d'autres travaux réalisés aux Etats-Unis, en France, Italie et Allemagne. L'étude la plus détaillée a été exposée par H. DIAS au Congrès de l'Office International du Vin à Lisbonne (Mai 1962).

Les travaux poursuivis à Colmar concernent :

1. l'amélioration des techniques de transmission du virus de vigne à plantes herbacées, pour obtenir de hauts pourcentages d'infection;
2. la recherche de nouveaux hôtes sensibles au virus;
3. la mise en évidence du virus par purification "in vitro" et l'emploi de celui-ci pour la préparation d'antiserums.

Les résultats obtenus au cours des 2 dernières années permettent d'envisager prochainement des méthodes de test sensibles pour le diagnostic de la présence du virus chez les plantes herbacées inoculées, ou même directement chez la Vigne.

PLANTES TEST

Pour l'obtention du virus par inoculation mécanique directement à partir de vigne des résultats positifs ont été obtenus avec Chenopodium amaranticolor, C. quinoa et Gomphrena globosa (var. "pourpre" et var. "Orange" Ets Tézier). Ces plantes peuvent être produites en serre

... / ...

toute l'année moyennant un éclairage d'appoint de novembre à février indispensable aux Chénopodes. L'hiver est la saison la plus favorable aux expériences; à partir de Juin les températures élevées de la serre amènent le masquage des symptômes même chez la plus sensible des 3 espèces C. quinoa.

Dans les conditions de température optimum (18-22°) C. quinoa réagit au bout de 12 jours (incubation minimum observée 7 j.) par un cloquage des jeunes feuilles avec éclaircissement des nervures formant un fin réseau, avec souvent une épinastie temporaire du sommet. Après cette phase de choc très caractéristique les symptômes s'estompent; la plante prend un aspect normal, restant cependant plus faible que les plantes saines.

C. amaranticolor se contamine moins facilement que C. quinoa, surtout si les plantes sont un peu trop développées lors de l'inoculation; la durée d'incubation est également plus longue, typiquement de 18 jours (incubation minimum observée 9 j). Les symptômes en revanche durent plus longtemps; ils consistent en une mosaïque par petits points ou fines lignes tortueuses débutant à la base des nouvelles feuilles; celles-ci subissent ensuite des déformations, assez intenses avec certaines souches du virus (D 207).

Gomphrena globosa var. "pourpre".
Au bon stade de sensibilité, cette espèce réagit d'abord par production de lésions locales olivâtres puis violettes sur les feuilles inoculées; 12 à 15 jours après apparaîssent des symptômes systémiques de mosaïque accompagnée de distortion ("twist") des jeunes feuilles. Il faut souvent aider l'extériorisation de ces symptômes systémiques en rognant les plantes sévèrement. D'une façon générale Gomphrena donne des % d'infection inférieurs à ceux des Chénopodes, mais cette plante est intéressante par sa longévité pour conserver sans repiquage les souches de virus.

La variété de Gomphrena "orange" est infectée sans symptômes.

De nouveaux hôtes du virus ont été recherchés par inoculation mécanique à partir des espèces précédentes.

Chez les Chénopodes C. album, C. giganteum et C. polyspermum ont montré des symptômes (choc intense avec nécrose de feuilles terminales chez cette dernière espèce). Le virus en est réisolé facilement sur quinoa. C. bonus Henricus n'a pas été sensible.

Ont été infectées également avec certaines souches de virus (b & C 873), Amarantus patulus (mosaïque plane), A. paniculatus (mosaïque et

... / ...

crispation du limbe), A. retroflexus (sans symptôme).

Ni les Nicotiana (N. rustica, N. tabacum "White Burley", N. Debneyi), ni le haricot (var. "Prince"), ni le concombre, ni le tétragone n'ont pu être infectés par nos souches de VMV (+), alors que ces espèces réagissent bien avec des virus de type ringspot étudiés parallèlement, notamment le virus de la mosaïque de l'Arabis (souche CADMAN 1960).

PERFECTIONNEMENTS APPORTES A LA TECHNIQUE DE TRANSMISSION MECANIQUE A PARTIR DE VIGNE

Les tissus de vignes malades sont broyés au sein d'une solution d'extraction neutralisant la forte acidité du suc de vigne et empêchant l'action dénaturante des composés phénoliques ou quinoniques formés par oxydation lors de la préparation de l'inoculum.

La méthode à la nicotine (1 g de feuilles de vigne + 4 cm^3 d'une solution à 2,5 % de nicotine base + eau 20 cm^3 CADMAN 1959) a permis d'obtenir des transmissions toute l'année, mais avec des pourcentages de réussite variant de 100 % à quelques unités seulement.

Des expériences répétées nous ont démontré que la cause des échecs tient à une teneur trop faible en virus dans l'inoculum :

1. Les jeunes pousses de vigne (5 à 10 cm.) sont très riches en virus; chez les plantes typiquement malades on obtient près de 100% d'infection.

2. Les pousses bien développées (70 cm. à 1 m.) de plantes cultivées en serre plusieurs mois, donnent par la méthode "directe" à la nicotine peu d'infections et l'incubation est longue (nécessité de rabattre les plantes pour favoriser l'extériorisation),

3. Si, à partir des mêmes plantes, on fait subir à l'inoculum une concentration en virus - par un cycle d'ultracentrifugation suivi de remise en suspension du culot dans un faible volume de tampon pH 7 - le % d'infection atteint alors 100 % et l'incubation peut être réduite à 8-10 jours.

... / ...

(+) sur les 28 conservées actuellement un seul isolement infecte le tétragone et donne des lésions locales sur cotylédons de concombre. Il se distingue cependant de la souche CADMAN de "Arabis mosaïc" en ne se généralisant pas chez le concombre ni chez le haricot.

Dans une expérience (Décembre 1962) à partir de V. rupestris malade les symptômes commençaient à apparaître le 9e jour dans la série "concentrée" (8 quinoa malades /9, 1 amaranticolor/4). Le 16e jour après l'incubation 100 % des plantes étaient malades dans la série "concentrée" alors que la série "directe" montrait seulement 1 quinoa malade/9 et 1 amaranticolor/4, soit 15 % .

Un autre essai montre des résultats analogues (tableau ci-dessous) :

I N O C U L U M S

		RUPESTRIS (palmettes & panachure)	CHARDONNAY (palmettes)	HYBRIDE OBERLIN (panachure)	Très jeunes pousses TRAMINER inoculé (palmettes)	Clône 249 témoin (sain)	Témoin (tampon +nicotine)
Série "directe"							
C. Quinoa	8ej	0	0	0	2/3 (+)	0/3	0/6
	9e	0	0	0	3/3	"	"
	10e	0	0	0	"	"	"
	11e	1/4	1/5	4/4	"	"	"
C. Amaranticolor	10e	0	0	0	2/3	0/3	0/6
	11e	1/6	0	0	2/3	"	"
Série "concentrée"							
C. Quinoa	8ej	5/6	0	4/5			
	9e	6/6	4/5	5/5			
	10e	"	5/5	"			
	11e	"	"	"			
C. Amar.	10e	0	0	6/6			
	11e	1/6	0	"			

(+) numérateur : plantes malades / dénominateur : plantes inoculées

PROPRIETES ET PURIFICATION DU VIRUS "IN VITRO"

Les caractéristiques du virus de la vigne (VMV) ont été déterminées dans les jus de plantes malades, de façon à obtenir sa purification avec un bon rendement.

1.) Dilution Limite

La concentration en virus chez C. quinoa, au stade de l'infection généralisée 12 à 15 jours après l'inoculation, a été déterminée par dilutions successives du jus brut avec un tampon phosphate 0,1 M pH 7. En Juin des infections étaient obtenues à une dilution de 1/500, mais plus à 1/1000. En Novembre des infections étaient obtenues (2 pl./6) encore à une dilution de 1/2000.

D'autres expériences ont confirmé une concentration en virus plus grande en hiver qu'en été.

2.) Température d'Inactivation

Des tubes capillaires scellés, contenant le jus de quinoa malade, ont été immergés 10 minutes au bain-marie à une température de 50 à 70°. Les jus ont donné des infections positives encore à 55° (2 pl./6) mais plus à 57°.

3.) Conservation "in vitro"

Des tubes capillaires analogues aux précédents, contenant du jus de chénopode malade, ont été conservés à la glacière (4° C) et à la température du laboratoire (20°). Des tests du pouvoir infectieux sur C. quinoa ont eu lieu après 4 - 7 - 11 - 22 - 34 et 64 jours. Des infections ont été observées (2 pl./6) après 34 jours de conservation à 4°, mais plus rien après 64 jours.

Chez la vigne, le broyat de 1 g de feuilles de vigne dans 5 cm^3 de solution d'extraction (2,5 % de nicotine base dans un tampon phosphate disodique 0,2 M + acide ascorbique 0,1 M) conservé à 4° en ampoules scellées était encore infectieux sur C. quinoa après 72 heures.

4.) Stabilité à différents pH

Un volume de jus infectieux est ajouté à un volume de tampon phosphate 0,05 M pour différentes valeurs de pH. Après conservation de 24 heures, les mélanges sont centrifugés et les surnageants réajustés à pH 7 sont inoculés à C. quinoa.

... / ...

Des infections positives ont été obtenues pour tous les pH testés, mais moins nombreuses à pH 4,4 (4 pl./12) qu'à pH 7 (11 pl./12) ou pH 9,1 (9 pl./11).

5.) Purification

Le virus (VMV) peut être purifié facilement à partir des jus de Chenopodium selon les techniques applicables aux virus de type "ringspot"; celles-ci font intervenir généralement une clarification préalable par le butanol-chloroforme (STEERE 1956), puis une sédimentation du virus par l'acétone (HENDERSON et WINGARD (1956), BERCKS et GEHRING (1956), OERTEL (1961) ou par ultracentrifugation.

Les chénopodes, surtout C. quinoa au début de l'apparition des symptômes foliaires (11 à 15 jours après l'inoculation), constituent une bonne source de virus. Les plantes sont récoltées au fur et à mesure et conservées à congélation (-10 à -15° C).

Pour une opération de purification 350 g sont prélevés, dégelés, broyés au hache-viande, le jus est exprimé, puis la pulpe est épuisée une ou plusieurs fois par un tampon phosphate disodique 0,2 M, contenant de l'acide ascorbique 0,1 M; le tout ajusté à pH 7. Les différents jus exprimés sont mêlés, clarifiés par centrifugation, à faible vitesse, puis soumis pendant 3 heures à une ultracentrifugation ("SPINCO" ROTOR 30, 30'000 tours mn) qui sédimente la totalité du virus.

Le culot d'ultracentrifugation, broyé au mortier dans environ 30 cm^3 d'eau, donne une suspension grossière qui doit être déféquée par agitation avec un volume de butanol + un volume de chloroforme glacés. Une courte centrifugation sépare la phase organique - plus dense - de la phase aqueuse qui contient la plus grande partie du virus; elle est soutirée à la seringue et soumise à un deuxième cycle d'ultracentrifugation ("SPINCO" - ROTOR 50, 50'000 tours mn, 1 heure).

Le culot du deuxième cycle d'ultracentrifugation est repris en plusieurs épuisements successifs, chaque fois par agitation dans un faible volume de tampon phosphate pH 7 - 0,1 M suivie d'une clarification à faible vitesse. Les épuisements sont poursuivis d'ordinaire jusqu'à obtention d'un volume d'extrait de 15 cm^3 environ (1/25^e de la masse de tissu de chénopode origine).

La suspension de virus purifié à partir de C. quinoa montre, au microscope électronique, des particules de virus en grand nombre (photo 2).

.../...

Elle est encore fortement infectieuse, mais 10 à 100 fois moins que le jus frais de chénopode, pour un titre de dilution homologue.

Il sera vraisemblablement possible de purifier le virus VMV directement à partir de la vigne.

Deux cycles de centrifugation différentielle

78'000 g 3 heures, puis 9'000 g 1 heure
150'000 g 1 heure , puis 9'000 g 1 heure

d'extraits de feuilles de vigne malades (Chardonnay et Rupestris) dans le tampon phosphate + acide ascorbique + nicotine sédimentent le virus en conservant le pouvoir infectieux.

S E R O L O G I E

Du virus (VMV souche Chardonnay panachure), concentré à partir de chénopodes, a été injecté au lapin pour l'obtention d'antisérums.

Des résultats positifs ont été obtenus par des injections intramusculaires de 1 cm^3 de virus purifié, émulsionné dans le même volume d'adjuvant de Freund (3 à 5 injections séparées par des périodes de repos de 8 à 15 jours).

Les sérums obtenus ont une forte action anti-protéines normales, mais pour les tests sérologiques la méthode de précipitation en milieu gélosé de OUDIN-OUTCHERLONY permet de distinguer les arcs de précipitation dus aux protéines normales et les précipités spécifiques dus à la protéine virus, qui sont les plus proches des réservoirs contenant l'antigène (photo 1).

Les arcs spécifiques sont très apparents avec des préparations de virus concentré; mais avec les jus bruts de C. quinoa malades, ils ne se forment que pendant la phase des symptômes de choc, lorsque la teneur en virus est forte. Avec des plantes au stade chronique, il est nécessaire de concentrer préalablement le virus par un cycle d'ultra-centrifugation.

On a réussi par une ultra-centrifugation d'extrait de vigne malade (Rupestris de l'expérience page 136) à obtenir des réactions de précipitation directement à partir de vigne en présence de l'antisérum VMV préparé à partir de chénopode. Les arcs de précipitation obtenus avec la vigne se raccordaient avec ceux des réservoirs contenant du virus VMV purifié à partir de C. quinoa (photo 1) indiquant ainsi l'identité de l'antigène chez la vigne et le chénopode.

... / ...

La méthode de test, en milieu gélosé, a été également employée pour tester le virus de la vigne en présence d'un antisérum préparé à partir du virus de la mosaïque de Arabis et réciproquement ce virus AMV en présence d'un antisérum VMV (souche panachure).

Des arcs précipités se formaient en présence des antisérums homologues, mais pas des antisérums hétérologues (photo 1).

Ce résultat nous étonne car CADMAN, HARRISON et DIAS ont obtenu des réactions sérologiques croisées entre les deux virus.

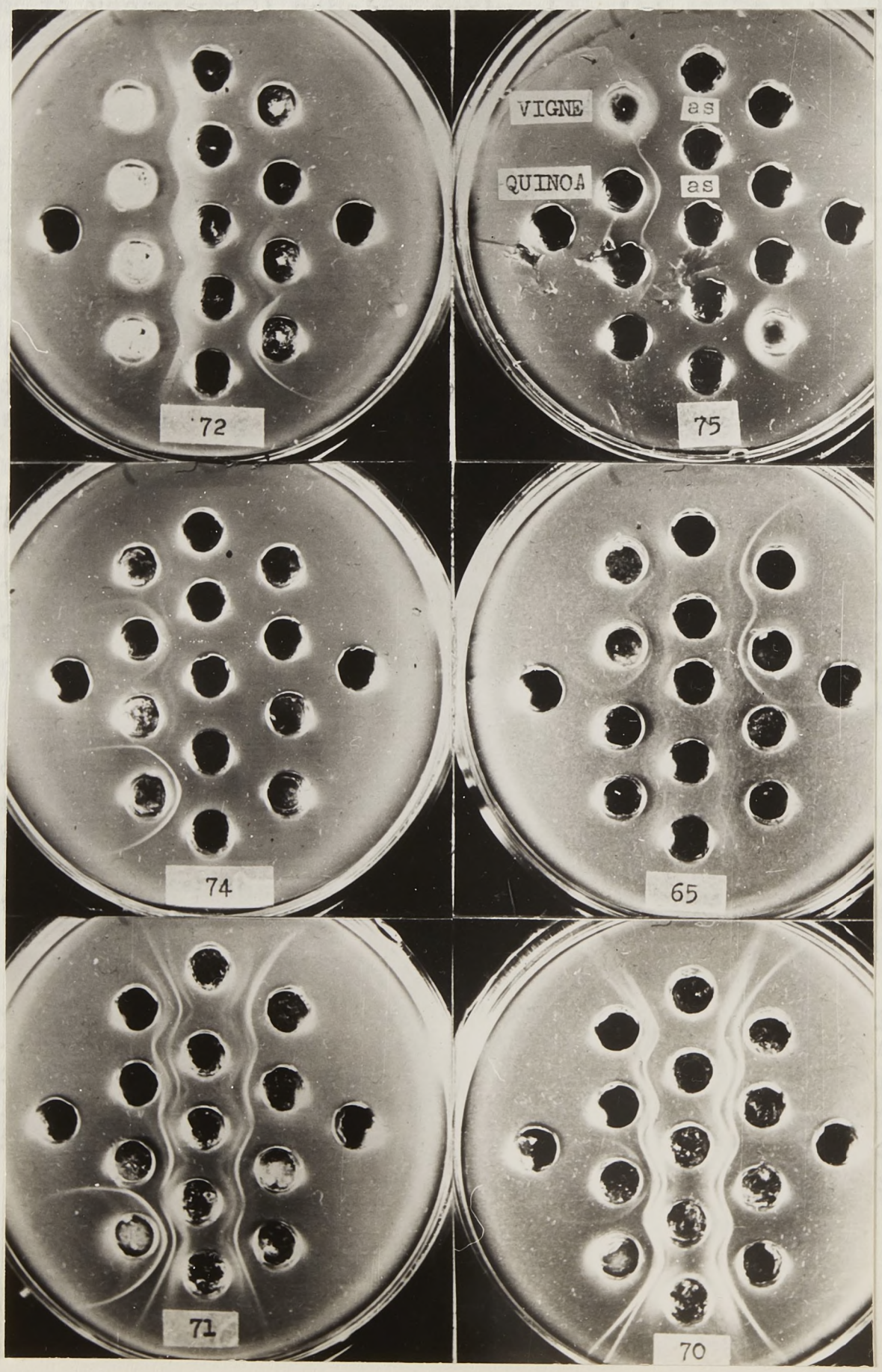
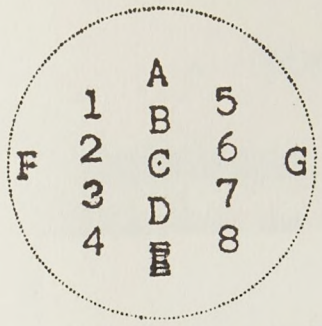


Photo 1 : REACTIONS SEROLOGIQUES EN MILIEU GELOSE

(méthode Oudin-Ouchterlony)



ligne centrale A à E = antisérum
F & G = sérum normal
réservoirs 1 à 8 = antigènes

Expérience 72

Arcs antivirus en 7 et 8 (extraits VMV concentrés, purifiés de C. amaranticolor et C. quinoa). Rien en 5 et 6 (extraits témoins sains). Les jus bruts de chénopodes sains en 1 et 2, ou malades en 3 et 4 (ici concentration en virus trop faible) donnent seulement des arcs anti-protéines normales. Dans les réservoirs A à E antisérum VMV n° 23 (souche Chardonnay panachure), préparé de C. quinoa.

Expérience 74

Tests sérologiques de fractions purifiées de VMV. Arcs de précipités antivirus avec les extraits de quinoa malade :
arc faible en 2 (1er cycle d'ultracentrifugation, concentration 2,5 fois), arc fort en 4 (2ème cycle, concentration 25 fois). Rien avec les extraits correspondants de quinoa sain en 1 et 3. Dans les réservoirs A à E antisérum VMV n° 23.

Expérience 75

Identité de l'antigène chez la vigne et le chénopode. Arcs antivirus avec extraits concentrés de vitis-rupestris malade, en 1 et 8. L'arc 1 se raccorde à l'arc 2 d'une préparation de VMV purifié de C. quinoa (réservoirs 2 à 7, successivement dilut. 1 - 1/2 - 1/4 - etc..) Dans les réservoirs A à E antisérum VMV n° 23.

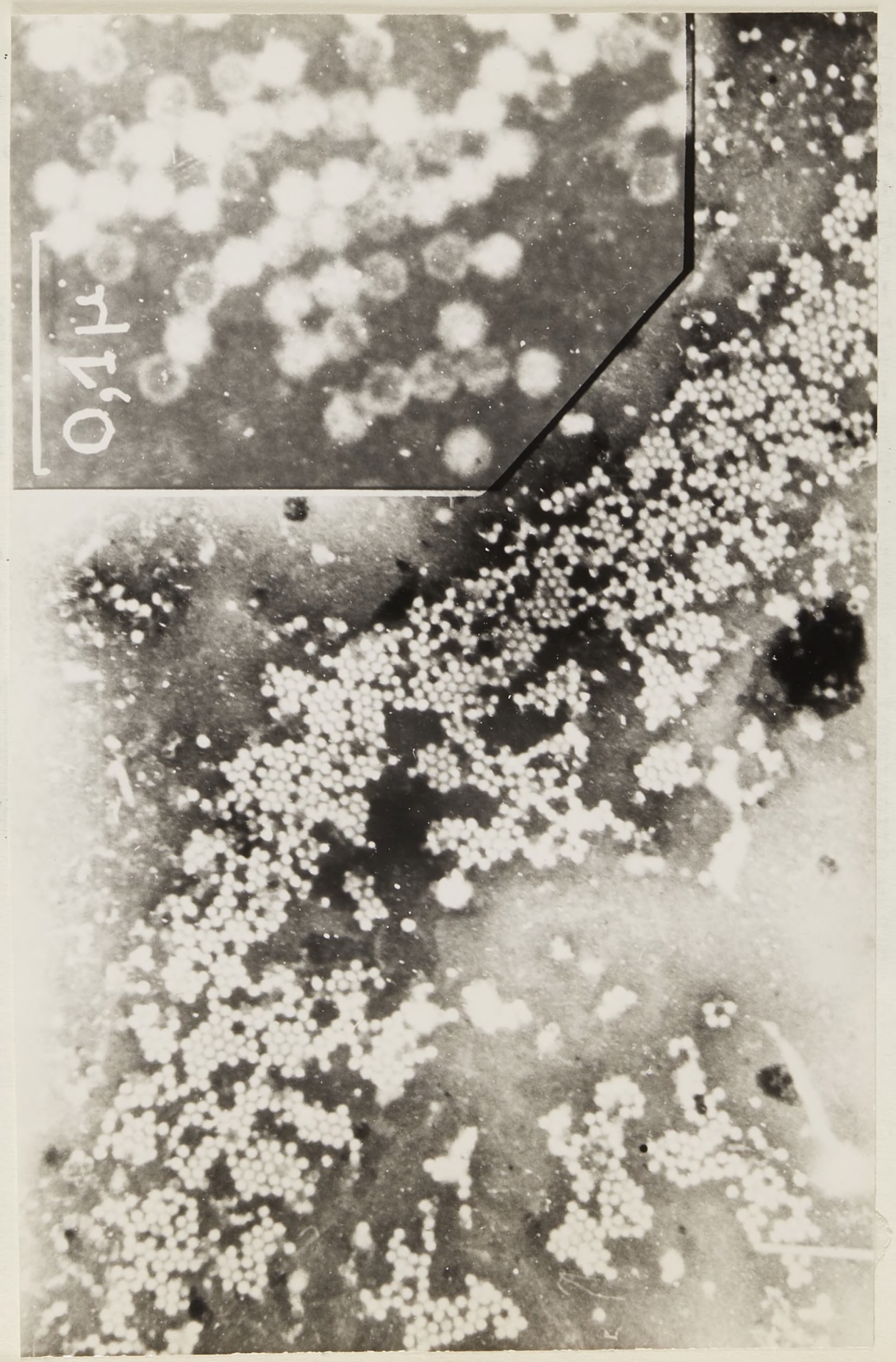
Expérience 65

En présence d'un antisérum de la mosaïque de l'Arabis (réservoirs A à E = antisérum VMA n° 8, dilut. 1/3 préparé de C. quinoa). On note :

- Arcs antivirus très nets en 5 et 6 avec quinoa VMA (arabis mosaïc souche CADMAN 1960.)

- Arcs faibles en 1 et 2 (souche G.O., seul isolement issu de vigne apparenté à VMA (cf. note supra.)

.... / ....


0,1μ

- Rien en 7 et 8 (quinoa VMV, souche Chardonnay panachure)

- Rien 3 et 4 (quinoa témoin sain).

Expérience 70 et 71

Les jus de chénopodes inoculés respectivement par VMA et VMV donnent un arc antivirus avec l'antisérum homologue, rien avec l'antisérum hétérologue :

Exp. 71 : réservoirs A à E = antisérum VMA n° 8
Exp. 70 : réservoirs A à E = antisérum VMV n° 23.

Le jus de quinoa VMV, en 3, donne un arc antivirus avec l'antisérum VMV (boîte 70), rien en présence de l'antisérum VMA (boîte 71).

Réciproquement, le jus de quinoa VMA, en 4, donne un arc antivirus intense en présence de l'antisérum VMA (boîte 71), rien en présence de l'antisérum VMV (boîte 70).

Pas d'arcs en 7 et 8 (jus de C. quinoa sain).

Noter avec le jus brut de C. quinoa une réaction anti-protéines normale intense, formant des lignes de précipités proches des réservoirs A et E d'antisérum. Les arcs spécifiques antivirus sont situés plus près des réservoirs d'antigènes.

PHOTO n° 2

Particules de virus (VMV, Chardonnay panaché) dans un extrait purifié de Chénopodium quinoa (méthode au butanol + chloroforme et ultracentrifugation). Cliché électronique Mme MICHON (méthode phosphotungstique).

HYPOTHESES SUR LES FONCTIONS DE L'ARN VIRAL

P. CORNUET
S. ASTIER

Les nombreux problèmes que posent la synthèse du virus dans la cellule peuvent se diviser en deux groupes, ceux relatifs à la synthèse de la protéine virale et ceux se rapportant à la replication de l'acide nucléique du virus. Pour le virus de la Mosaïque du Tabac la partie protéique d'un poids moléculaire de 37×10^6 se présente sous la forme d'un empilement hélicoïdal de 2130 sous unités constituant une sorte de cylindre creux de 300mμ de long sur 15 à 18mμ de large. Chacune des sous unités est constituée d'une chaîne polypeptidique de 158 acides aminés. La biosynthèse de cet ensemble procède, semble-t-il du schéma général de la biosynthèse protéique; l'acide nucléique viral porte sur une partie des nucléotides l'information nécessaire à la séquence des acides aminés dans les sous unités protéiques. Lorsque cet information est fournie aux ribosomes de la cellule ceux-ci réalisent la synthèse de la protéine virale au même titre que celle des protéines normales.

L'acide ribonucléique viral est constitué d'une chaîne de 6.400 nucléotides dont le nombre de résidus Adenyliques, Guanylique, Uridyliques, Cytidyliques, est respectivement de 1900, 1680, 1740, 1180; cette chaîne à un seul brin s'insère en spirale entre les sous-unités de la protéine qui la protège, l'intégrité structurale de la chaîne paraît indispensable au maintien du pouvoir infectieux, elle porte à elle seule l'information nécessaire à sa propre replication, à la synthèse du manteau protéique et aux perturbations métaboliques de l'hôte se traduisant par les symptômes.

Le problème de la biosynthèse virale revient donc à celui d'une chaîne polynucléotidique de 6400 unités, c'est-à-dire en fin de compte à trouver un système enzymatiques agissant en polymerase qui " accroche " 6400 nucléotides les uns à la suite des autres dans l'ordre prédéterminé pour le modèle que représente la chaîne d'ARN viral initiale. L'existence de cet enzyme dans la cellule infectée paraît de jours en jours s'établir avec plus d'évidence. Mais à peine ce point pourtant fondamental s'éclaircit que le problème semble déjà déplacé ; de nouveaux innombrables pourquoi se posent : Problèmes de localisation, de spécificité d'action du système, de rapports entre DNA hôte et RNA viral, de concurrence avec les phénomènes de régulation etc..

Pour essayer au moins de sélectionner les problèmes en rapport direct avec la présence de l'ARN viral, on peut essayer de poser la question à rebours en se demandant à quoi servent les 6400 nucléotides informateurs.

.../...

Dans un code à triplets la protéine virale est codée par 158 X 3 = 474 bases, il reste donc 5900 bases correspondant à 1960 signaux.

A quoi servent-ils ?

On peut assurer qu'ils codent au moins en partie la synthèse protéique, F.CONRAT et NIRENBERG ont montré la stimulation d'incorporation d'acides aminés inexistants dans la protéine virale (voir dans ce numéro de virologie appliquée, l'article de BOISTARD).

Posons en hypothèse que deux fonctions au moins peuvent être assignées à cette partie d'information.

1° - La réplication de l'ARN viral
2° - L'inhibition de diverses fonctions normales de la cellule.

Replication de l'ARN viral

Le système enzymatique peut préexister dans la cellule au moins en potentialité et dans ce cas l'information virale correspondrait à une fonction de répresseur, bloquant un système régulateur de l'hôte pour favoriser l'enzyme en question. Cette éventualité engagerait le DNA de l'hôte dans des rapport étroits avec la synthèse de l'ARN viral.

YOUNG TAI KIM et WILDNAN ont cru déceler la présence dans des homogénéisats de feuilles de Tabac infectés, d'un complexe DNA-RNA de la Mosaïque du Tabac sensible à la DN ase

Par analogie avec les systèmes enzymatiques synthétisant le RNA messager sur le modèle du DNA de la cellule, ces auteurs ont émis l'hypothèse que des hybrides DNA cellulaires - RNA viral serviraient de moule pour la synthèse du RNA viral ; ou plus simplement que les fibres du DNA serviraient de piège pour capter et retenir les matériaux qui bout à bout, formeront la chaîne du RNA viral. Il semble cependant que la synthèse du RNA viral des virus à RNA est totalement indépendante du DNA de l'hôte comme FRANCKLIN l'a montré dans le cas de Mengovirus. La synthèse de ce virus n'est pas altérée dans des cellules où toute synthèse de RNA normal est bloquée par action de l'Actinomycine D. L'enzyme responsable de la replication du RNA du Mengovirus a été isolé, il n'est pas sensible à la DNAse , et n'a pas besoin d'un modèle de DNA. Par ailleurs, on ne voit pas bien comment l'hôte pourrait posséder des systèmes enzymatiques spécifiques pour chacun des virus qui risquent un jour de la contaminer.

Les bactériophages nous apportent un exemple où l'on a pu montrer que tout un groupe d'enzymes devrait être directement codé par le virus, à savoir les enzymes responsables de la synthèse de l'hydroxymethyldesoxycytidine, nucléoside qui n'existe pas dans les bactéries non infectées.

.../...

Supposons donc que l'information pour la polymérase est bien portée directement par la chaîne d'ARN viral, de nouvelles difficultés surgissent. Il semble que dans le cas de MT la synthèse de l'ARN a lieu dans le noyau (bien qu'aucun travail d'autoradiographie ne l'ai démontré) tandis que celle de la protéine s'effectue sur les ribosomes cytoplasmiques, donc deux localisations pour des informations portées sur le même support.

Il faut alors formuler l'hypothèse selon laquelle il existerait des milieux préférentiels dans la cellules pour la synthèse de certains types de protéines, les ribosomes nucléaires étant par exemple dans un milieu favorable au maintien et au fonctionnement des polymérases, la notion de ces milieux parait d'ailleurs faire jour avec les travaux d'ALLFREY sur le rôle des polyanions dans les synthèses nucléaires. En gros si l'on veut tenter d'expliquer les diverses localisation on peut schématiser l'infection comme suit : de nombreuses particules virales collaborent à l'infection, certaines sont immédiatement détruites par les ribonucléases, d'autres fixées par les ribosomes cytoplasmiques pour y faire le manteau protéique mais sans utilité, d'autres encore sur ces mêmes ribosomes pour y induire la synthèse de la polymerase mais qui restera non fonctionnelle parce que hors du milieu propice, enfin un très petit nombre atteignent les ribosomes nucléaires et l'infection est désormais irréversible, la polymerase spécifique est synthétisée dans un milieu favorable a son maximum d'activité.

Deuxième fonction : l'inhibition

On pourrait croire que la fonction d'inhibition des synthèses normales est une corrélation de la précédente. Dans une cellule âgée de tabac les synthèses vitales se font sur un rythme lent, l'état de survie minimum est atteint mais que l'infection se réalise et 40 minutes après,60.000.000 de particules ont été synthétisées. Véritable coup de fouet,la synthèse virale n'apparaît donc pas seulement comme une compétition entre les ARN messagers d'un code normal et d'un code viral. En d'autres termes la potentialité du virus comprend quelquechose de plus que le simple drainage des nucléotides et des acides aminés.

C'est probablement la fonction la plus mystérieuse du virus, celle qui doit déterminer une partie importante des variations de symptomatologie entre les souches d'un même virus. Le blocage de la synthèse du RNA dépendant DNA a été étudié pour le Mengovirus elle semble se manifester avant même l'apparition des premieres chaînes d'ARN viral. Le mode d'action de ce blocage se ferait-il par l'intermédiaire de la synthèse d'une protéine qui agirait en répresseur au niveau de la chromatine de l'hôte, protéine codée par le RNA viral et elle aussi synthétisée préférentiellement sur les ribosomes nucléaires ?

.../...

Un des points qui reste un écueil pour l'expression de cette fonction réside dans la nécessité de l'intégrité structurale de la chaîne virale ; on ne voit pas très bien pourquoi il ne peut y avoir de dénaturation de la partie du code correspondant à cette fonction non essentielle, sans qu'elle n'entraîne l'inactivation de la fonction principale, la fonction polymerase.

L'inhibition des processus normaux par le virus explique assez bien certain symergisme dans les infections à plusieurs virus mais cette fonction nécessite encore bien des éclaircissements si l'on veut notamment lui assigner des valeurs qualitatives diverses, selon les souches.

Cet ensemble d'hypothèses parait former une construction encore bien fragile mais elle éclaire certains faits demeurés longtemps inexpliqués tels que le phénomène de prémunition. En suivant la voie tracée ci-dessus on imagine fort bien que la polymerase peut-être spécifique d'un virus et non d'une souche, la cinétique enzymatique rendant compte ensuite des limites d'action du système ; ainsi lorsqu'une 2° souche est introduite elle trouve la polymerase dans une zone de vitesse nulle en raison de la saturation en produit de réaction , les nouvelles molécules de polymerase induites par cette 2è souche ne peuvent en rien changer cet état de faits et la replication ne s'effectue pas.

En résumé les 6400 nucléotides de l'ARN du virus MT pourraient porter une triple information.

- celle du manteau protéique
- celle d'une ou d'un groupe de polymerases
- celle de protéines à fonctions répressives

Si ces hypothèses se vérifient le virus MT peut-être qualifié d'élément autoreproductible autonome agissant comme un parasite au niveau moléculaire de l'hôte et l'on peut prédire que la biosynthèse de cet élément doit refléter ce caractère d'individualité et s'exprimer par une cinétique particulière au vivant.

SERVICE DE VIROLOGIE

STATION CENTRALE DE PATHOLOGIE VEGETALE

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Route de St Cyr VERSAILLES - (France)

Etudes de virologie appliquée n°4 mars 19